



TÄYDELLISEN VERENKUVAN SÄILYVYYSTUTKIMUS

Seinäjoen keskussairaalan klinisen
kemian toimintayksikössä

Werner Hyvärinen

Jesse Lehtola

Opinnäytetyö
Lokakuu 2012
Bioanalytiikan koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
K09MBIOAN

HYVÄRINEN, WERNER & LEHTOLA, JESSE: Täydellisen verenkuvan säilyvyys-tutkimus. Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä.

Opinnäytetyö 81 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Lokakuu 2012

Täydellinen verenkuvaa on yksi yleisimmistä laboratoriotutkimuksista. Täydelliseen verenkuvaa kuuluu lukuisia eri osatutkimuksia: erytrosyytit sekä niiden indeksit, hemoglobiini, hematokriitti, leukosyytit, trombositit, retikulosyytit ja leukosyyttien erittely-laskenta. Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksikössä analysoidaan vuosittain noin 18 000 täydellistä verenkuvaa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten EDTA-verinäytteet säilyvät, kun niitä säilytetään huoneenlämmössä kahdeksan tuntia ja 24 tuntia. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa informaatiota siitä, ovatko täydellisten verenkuvanäytteiden tulokset luotettavia pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Seinäjoen keskussairaala hyödyntää tätä informaatiota suunnitellessaan maakunnasta tulevien näytteiden kuljetusolosuhteita. Opinnäytetyön aihe saatiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian toimintayksiköstä.

Opinnäytetyössä käytettiin kokeellista vertailevaa tutkimusmenetelmää. Tutkimusai-
neistona oli 142 EDTA-veriputkea, joista määritettiin täydellinen verenkuvaa. Näistä 36
kuului vertailuryhmään joita säilytettiin +4 °C jääkaappilämpötilassa. Jokaiselle vertai-
luryhmän EDTA-veriputkelle oli myös vastinputki, jota säilytettiin huoneenlämmössä.
Näytteet mitattiin mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Tämän jälkeen näytteet
mitattiin kahdeksan tunnin ja 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittämisestä. Näyttei-
den analysointiin käytettiin Sysmex® XE-5000 –verenkuvaa-analysaattoria. Saadut tu-
loket analysoitiin tilasto-ohjelmilla ja niitä havainnollistettiin graafisten kuvaajien sekä
taulukoiden avulla.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että seuraavat erytrosyyttiparametrit eivät säily
tutkimuskelpoisina vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen: hematokriitti,
MCV, MCHC, RDW-SD ja RDW-CV. Näistä parametreista vain MCHC laskee hu-
oneenlämpösäilytyksen jälkeen, muiden parametrien tulokset kohoavat. Kyseisissä para-
metreissa on havaittavissa muutoksia myös kahdeksan tunnin huoneenlämpösäilytyksen
jälkeen. Jääkaappilämpötilassa parametrit säilyivät lähes muuttumattomina 24 tunnin
ajan. Muihin täydellisen verenkuvan parametreihin ei 24 tunnin huoneenlämpösäilytyk-
sen jälkeen synny selvää muutosta. Opinnäytetyön luotettavuutta lisää se, että kaikki
EDTA-verinäytteet analysoitiin samalla analysaattorilla ja että kaikilla vertailuryhmän
näytteillä oli vastinputki huoneenlämpösäilytyksessä. Jatkotutkimusaiheena voisi olla
huoneenlämpösäilytyksen vaikutus leukosyyttien morfologiaan.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Hyvärinen, Werner & Lehtola, Jesse: Preservation Study of the Complete Blood Count in the Department of Clinical Chemistry at Seinäjoki Central Hospital

Bachelor's thesis 81 pages, appendices 4 pages
October 2012

One of the most common laboratory examinations in haematology is complete blood count. Complete blood count consists of information about leukocytes, erythrocytes, thrombocytes and reticulocytes. Around 18 000 complete blood counts are analysed per year in the Department of Clinical Chemistry at Seinäjoki Central Hospital.

The purpose of this thesis was to study how EDTA blood samples act when stored 24 hours in room temperature. The objective of this thesis was to produce information on whether the results of the complete blood count samples are reliable after prolonged storage in room temperature.

The study consisted of 142 complete blood count samples that were analysed as soon as possible after sampling. These 142 samples included a control group of 36 samples. The control group was stored in +4 °C temperature in a refrigerator. The samples were analysed again after eight and 24 hours after the first measurement. The samples were analysed using Sysmex[®] XE-5000 automated haematology analyser. This thesis was quantitative and experimental in nature.

The study indicates that after 24 hours of storage in room temperature some of the red blood cell indices begin to vary compared to the first measurement. These red blood cell indices began to vary already after 8 hours of storage in room temperature. After 24 hours there were no notable changes in the control group's complete blood count results. There were no clear systematic changes in other complete blood count's parameters after 24 hours of storage in room temperature

Key words: complete blood count, EDTA, Sysmex[®] XE-5000

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	TÄYDELLINEN VERENKUVA JA SOLUSARJAT.....	8
2.1	Erytrosyytit ja niihin liittyvät tutkimukset.....	10
2.2	Granulosyytit	13
2.2.1	Neutrofiilit.....	13
2.2.2	Eosinofiilit ja basofiilit.....	15
2.3	Lymfosyytit.....	16
2.4	Monosyytit	18
2.5	Trombosyytit.....	19
3	EDTA-ANTIAGOAGULANTTI.....	21
3.1	EDTA:n toimintaperiaate.....	21
3.2	Preanalyttisten tekijöiden vaikutus	22
3.3	Ajan vaikutus EDTA-verinäytteen säilyvyyteen	23
4	SYSMEX® XE-5000 VERENKUVA-ANALYSAATTORI	27
4.1	Radiofrekvenssi/tasavirtadetektio (RF/DC).....	28
4.2	Hydrodynaaminen fokusointi	29
4.3	Puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometria.....	30
4.4	Eteenpäin ja sivuille sironnut sekä fluoresoiva valo.....	31
4.5	Natriumlauryylisulfaatti-hemoglobiinimenetelmä.....	31
4.6	Sysmex® XE 5000:n reagenssit, kontrollit ja niiden säilytys	32
5	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA ONGELMAT	37
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	38
7	TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN	42
7.1	Esitutkimus	42
7.2	Tutkimusaineiston hankinta ja valinta	43
7.3	Näytteiden määrittäminen ja tulosten kirjaaminen	44
8	TUTKIMUSTULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	47
8.1	Kahdeksan tunnin määrittäminen.....	48
8.2	24 tunnin määrittäminen	57
8.3	Johtopäätökset.....	65
	POHDINTA	69
	LÄHTEET	73
	LIITTEET	78

1 JOHDANTO

Täydellinen verenkuvasta eli TVK on yksi yleisimmistä laboratoriotutkimuksista. Verenkuvasta saadaan informaatiota esimerkiksi potilaan erytrosyyttituotannosta ja erytrosyyttien hapensiirtokapasiteetista niiden arvoja (red blood cells, RBC) tarkastelemalla. Leukosyyttien kokonaismäärästä (white blood cells, WBC) ja erittelylaskennasta saadaan tietoa potilaan immuunijärjestelmän toiminnasta. Trombosyyteistä (platelets, PLT) saadaan tietoa potilaan trombosyyttien määrästä ja koosta. Täydellistä verenkuvaa voidaan käyttää muun muassa immunopuutosten ja akuuttien verenvuototilojen yhteydessä sekä anemioiden ja leukemioiden diagnostiikassa. (Camitta & Slye 2012, 72-77; Savolainen 2007, 88-92; George-Gay & Parker 2003, 96-114; Van den Bossche ym. 2002, 69-73.) Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian laboratoriossa analysoidaan vuosittain noin 18 000 TVK-näytettä.

Verisolut muodostuvat hematopoieettisesta kantasolusta ja ne kehittyvät pääosin luuytimessä, vaikka sikiökaudella verisolut voivat muodostua muuallakin (Siitonen & Koistinen 2007, 16; Vilpo 2010, 15-16). Hematopoieettinen kantasolu on monikykyinen eli se pystyy tuottamaan jokaisen verisolulinjan soluja. Se pystyy tuottamaan itsensä kaltaisia kantasoluja tai erilaistuneempia jälkeläisiä. (Siitonen & Koistinen 2007, 17; Williams 2004, 22.) Täydellisessä verenkuvassa määritetään pääasiassa kypsiä verisoluja ja niiden parametreja. Verenkuvaa-analysaattorit antavat kuitenkin laitehälytysten avulla tietoa myös verisolujen nuoruusmuodoista.

Täydellinen verenkuvaa analysoidaan automaattisilla verenkuvaa-analysaattoreilla. Nykypäivänä kehittyneimmissä analysaattoreissa on mahdollista saada jopa yli 20 parametria täydelliseen verenkuvaan. Useimmissa tilanteissa analysaattorit antavatkin tulokset nopeasti ja luotettavasti. Virheellisiä tuloksia voivat aiheuttaa esimerkiksi näytteen lipeemisyys ja hemolyysi tai näytteessä mahdollisesti olevat agglutiniinit ja kryoglobuliinit. Näyte otetaan antikoagulanttia, yleensä etyleenidiamiinitetraetikkahappoa eli EDTA:ta, sisältävään putkeen. (Zandecki, Genevieve, Gerard & Godon, 2007, 21-41; Savolainen 2007, 88-92.)

Antikoagulantti on aine, jota käytetään veren hyytymisen estämiseen in vitro (Banfi, Salvagno & Lippi 2007, 565-576). Etyleenidiamiinitetraetikkahappoa eli EDTA:ta suositetaan antikoagulanttina laboratoriotutkimuksissa, erityisesti verenkuvatutkimuksissa, koska se estää veren hyytymisen täydellisesti ja aiheuttaa minimaalisia muutoksia solujen morfologiaan. (Lippi & Plebani 2012, 1281–1285; Perkins 2009, 1.) Se estää veren hyytymisen kelatoimalla kalsiumia, joka on tarpeellinen monille veren hyytymiskaskadin entsyymireaktioille (Lippi ym. 2007, 565). Opinnäytetyössä käytettiin veriputkia, joiden sisäosat oli päällystetty kuivamuotoisella K2-EDTA:lla.

Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa käytetään TVK:n analysointiin Sysmex® XE-5000 –analysaattoria. Analysaattoreita on kliinisen kemian laboratoriossa kaksi. Kumpaakin analysaattoria käytetään myös päivystysaikana. Toista analysaattoria käytetään opinnäytetyön kokeellisen osuuden suorittamiseen. Normaalisti näytteet määritetään analysaattorin suljetulla puolella, lukuun ottamatta mikroputkiin otettuja näytteitä, jotka määritetään aina avopuolella. Avopuolella analysoidaan näytteitä, jotka pitää tietyistä syistä määrittää yksittäin, esimerkiksi jos EDTA-veriputkessa on pieni verimäärä. Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa TVK-näytteitä sekoitetaan 2-5 minuuttia koeputkisekoittajassa. Mikroputkia sekoitetaan käsin 8-10 kertaa.

Opinnäytetyön aihe saatiin alkusyksystä 2011 Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin kliinisen kemian toimintayksikön ylikemisti Kari Åkermanilta. Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, miten EDTA-verinäytteet säilyvät, kun niitä säilytetään huoneenlämmössä 24 tuntia. Opinnäytetyössä käytetään kokeellista tutkimusmenetelmää. Opinnäytetyöstä on rajattu pois retikulosyytit sekä niistä johdetut parametrit ja leukosyyttien prosentuaaliset osuudet.

Seinäjoen keskussairaalassa analysoidaan EDTA-verinäytteitä koko maakunnan alueelta. Maakunnista tulevien näytteiden huoneenlämpösäilytysaika saattaa pitkittyä välimatkojen takia. Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa informaatiota siitä, ovatko täydellisten verenkuvanäytteiden tulokset luotettavia pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Seinäjoen keskussairaala hyödyntää tätä informaatiota suunnitellessaan kuljetusolosuhteita.

Opinnäytetyön teoriaosuuden alussa käsitellään hematopoiesia ja täydellistä verenku-
vaa ja sen indikaatioita. Tämän jälkeen esitellään yleisesti EDTA-antikoagulantin toi-
mintaperiaatetta ja sen virheellisen konsentraation vaikutusta näytteessä. Kappaleessa
tuodaan esille ajan ja sekoituksen vaikutus EDTA:n toimintaan. Opinnäytetyössä käy-
tettävän Sysmex[®] XE-5000 –analysaattorin toimintaperiaatteet ja reagenssit käsitellään
EDTA-antikoagulantti -kappaleen jälkeen. Menetelmälliset lähtökohdat ja tutkimuksen
suoritus on esitetty pääpiirteittäin. Tutkimuksesta saatuja tuloksia on havainnollistettu
laatikkoviikset- eli boxplot -kaavioita käyttäen.

2 TÄYDELLINEN VERENKUVA JA SOLUSARJAT

Täydellinen verenkuv (B-TVK) on päivystystutkimus, jolla tutkitaan perifeerisessä veressä olevia soluja ja niiden ominaisuuksia. Normaalisti veressä esiintyy viiden eri leukosyyttilinjan soluja: lymfosyyttejä, basofiilejä, eosinofiilejä, monosyyttejä ja neutrofiilejä. (EPSHP 2011a.) Näiden solujen lisäksi veressä esiintyy erytrosyyttejä, trombosittejä ja tapauksesta riippuen retikulosyyttejä (Siitonen & Koistinen 2007, 16).

Täydellistä verenkuvaa analysoidaan, sillä erilaisissa patologisissa ja fysiologisissa tiloissa leukosyyttien määrät ja suhteet vaihtelevat huomattavasti. Kohonneita leukosyyttiarvoja tavataan mm. akuuteissa bakteeri-infektioissa, joissain virusinfektioissa ja sydäninfarktissa. Tietyt lääkeaineet voivat lisätä granulosityttien määrää veressä, leukemioissa taas leukosyyttien määrä voi olla erittäin korkea, matala tai normaali. Alentuneita leukosyyttipitoisuuksia voidaan havaita eräissä bakteeri-infektioissa, kuten myös joissain virusinfektioissa. Erytrosyyttien pitoisuuteen ja ominaisuuksiin vaikuttavat mm. eri anemiat. Yleisimmät indikaattorit täydelliselle verenkuvalla ovat hematologisten maligniteettien ja infektioautien diagnostiikka. Täydellistä verenkuvaa hyödynnetään myös näiden sairauksien ja luuydintoksisten lääkehoitojen seurantaan. (EPSHP 2011a; EPSHP 2011b.)

Täydellinen verenkuvatutkimus pitää sisällään monta eri osatutkimusta. Leukosyytit vastataan kokonaismääränä (B-Leuk) ja eriteltynä neutrofiileiksi (B-Neut), eosinofiileiksi (B-Eos), basofiileiksi (B-Baso), lymfosyyteiksi (B-Ly) ja monosyyteiksi (B-Monos). Erittelylaskennan tulokset esitetään absoluuttisina ja prosentuaalisina arvoina. Erytrosyyteistä vastataan niiden kokonaismäärän (B-Eryt) lisäksi muita mitattuja arvoja ja laskennallisia parametreja. Täydelliseen verenkuvatutkimukseen kuuluvat myös trombositien absoluuttinen arvo (B-Trom) ja retikulosyyttien (E-Retik) absoluuttinen ja prosentuaalinen arvo. Retikulosyyteistä osastoille vastataan vain prosentuaalinen arvo. (EPSHP 2011a; EPSHP 2011b; EPSHP 2012.) Kaikkien osatutkimuksien viitearvot löytyvät liitteestä 1.

Lukuisten eri osatutkimusten lisäksi Sysmex® XE-5000 analysaattori kykenee antamaan TVK –tulokseen erilaisia liputuksia (liite 3). Termi liputus tulee englanninkielisestä sanasta Flag, jolla tarkoitetaan Sysmex® XE-5000 analysaattorin antamia hälytyksiä. Liputuksia ovat leukosyytti-, erytrosyytti- ja trombositihälytykset. Hälytyksiä on

kahdenlaisia: abnormal ja suspect. Abnormal –hälytys tarkoittaa, että näytteen tulokset ovat viitearvojen ulkopuolella. Suspect –hälytys puolestaan tarkoittaa, että näytteessä on normaalia poikkeavia soluja. Normaalista poikkeavat solut voivat olla solusarjojen nuoruusmuotoja tai atyyppisiä soluja, joita ei normaalisti tavata perifeerisessä veressä. Sysmex® XE-5000 verenkuvaa-analysaattori pystyy tunnistamaan, että nämä solut eivät ole normaaleja, mutta se ei kykene luotettavasti vastaamaan mitä soluja poikkeavat solut ovat, jolloin näyte täytyy mikroskopoida. (Roche Diagnostics Oy ND.) Tämän vuoksi bioanalyytikon täytyy tunnistaa verisolulinjojen kypsyvät solut.

Verisolut kehittyvät hematopoieettisesta kantasolusta pääosin luuytimessä ja ne syntyvät solujakautumisen, linjavalinnan erilaistumisen ja kypsymisen kautta (Siitonen & Koistinen 2007, 16). Luuytimen hematopoieesia kutsutaan medullaariseksi ja muualla tapahtuvaa verensolujen muodostusta ekstramedullaariseksi (Vilpo 2010, 15). Ekstramedullaarinen hematopoieesi on normaalia sikiökaudella, jolloin hematopoieesia tapahtuu ruskuaispussissa, pernassa, imusolmukkeissa, kateenkorvassa ja maksassa (Vilpo 2010, 15-16; Siitonen & Koistinen 2007 17; Hoffbrand & Moss 2011, 2).

Luuytimen hematopoieesi alkaa noin 10. raskausviikolla, mutta maksa ja perna ovat tärkeimpiä verenmuodostajia aina 6-7 kuukauteen asti (Vilpo 2010, 15; Hoffbrand & Moss 2011, 2). Syntymään mennessä luuytimestä on muodostunut tärkein verensoluja tuottava elin ja suurin osa hematopoieettisista kantasoluista sijaitsevat siellä (Siitonen & Koistinen 2007, 17; Hoffbrand & Moss 2011, 2). Lapsilla kaikkien luiden luuydinontelossa on verta muodostavaa kudosta, mutta murrosikää lähestyttäessä hematopoieesia esiintyy vain litteissä luissa, kylkiluissa, nikamissa, kallossa, selkärangassa, rintakehässä lapaluissa, lantiossa sekä raajojen pitkien putkiluiden ydinosissa (Vilpo 2010, 15; Siitonen & Koistinen 2007, 17; Hoffbrand & Moss 2011, 2).

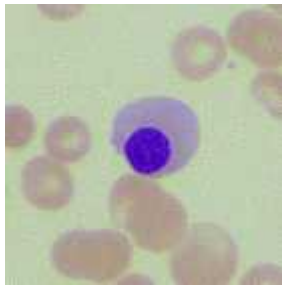
Kaikkein varhaisimmasta hematopoieettisesta kantasolusta HSC (hematopoietic stem cell), pystyy muodostumaan kaikkia verisolulinjoja, siksi sitä kutsutaan monikykyiseksi kantasoluksi (Williams 2004, 22). Monikykyinen hematopoieettinen kantasolu pystyy tuottamaan itsensä kaltaisia kantasoluja tai erilaistuneempia jälkeläisiä. (Siitonen & Koistinen 2007, 17; Williams 2004, 22).

Monikykyinen kantasolu erilaistuu erilaisten ärsykkeiden vuoksi suuntautuneeksi kantasoluksi, joka on erilaistumiskyvyiltään rajoittuneempi kuin monikykyinen kantasolu. Monikykyisen kantasolun linjavalintaan vaikuttavat erilaiset kasvutekijät, geeniluentaa säätelevät tekijät ja luuytimen mikroympäristön vaikutus. Suuntautuneista kantasoluista syntyy vain tiettyjä verisolulinjoja. (Vilpo 2010, 15–16; Siitonen & Koistinen 2007, 17–19.)

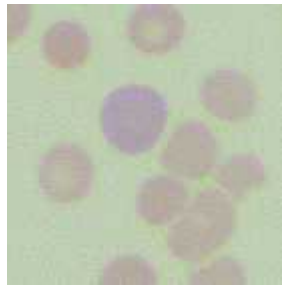
2.1 Erytrosyytit ja niihin liittyvät tutkimukset

Erytrooisen linjan suuntautunut kantasolu BFU-E (burst-forming units-erythroid) on erilaistunut myelooisesta kantasolusta CMP (common myeloid progenitor), jota kutsutaan myös CFU-GEMM (Colony-forming units-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte) -kantasoluksi. Jatkossa tässä työssä viitataan myeloiseen kantasoluun CMP – lyhenteellä. Suuntautuneesta kantasolusta BFU-E kypsyy edelleen CFU-E (colony-forming units-erythroid) -solu, jonka jälkeen vuorossa ovat kypsyvät solut. (Papayannopoulou, D’Andrea, Abkowitz & Migliaccio 2005, 267; Vilpo 2010, 16; Siitonen & Koistinen. 2007, 24 -25.)

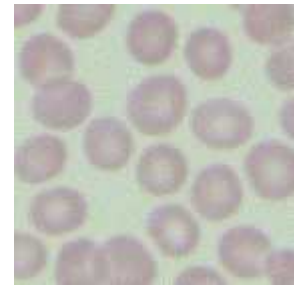
Erytrosyyttilinjan kehitysasteet ovat CFU-E -solun jälkeen järjestyksessä: proerytroblasti, basofiilinen erytroblasti, polykromaattinen erytroblasti, ortokromaattinen erytroblasti, retikulosyytti ja erytrosyytti (kuvat 1.a, b, c, sivu 11) (Siitonen & Koistinen 2007, 24; Hoffbrand & Moss 2011, 16-17). Erytrosyyttilinjan solut kypsyvät retikulosyyttivaiheeseen asti luuytimessä, jonka jälkeen retikulosyytit siirtyvät verenkiertoon ja pernaan. Pernassa retikulosyytti kypsyy noin 1-2 päivässä erytrosyytiksi ja siirtyy verenkiertoon. Luuytimeen ei jää merkittävää erytrosyyttivarastoa vaan n. 95 % erytrosyytesitä on verenkierrossa. (Siitonen & Koistinen. 2007, 24 -25; Hoffbrand & Moss 2011, 16–17.)



KUVA 1.a



KUVA 1.b



KUVA 1.c

Kuvat esittävät erytrosyytin kypsymisen erytroblastista (kuva 1.a) retikulosyytin (kuva 1.b) kautta kypsäksi erytrosyytiksi (kuva 1.c). (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Erytrosyyttien kokonaismäärän lisäksi TVK –tutkimuksessa vastataan hemoglobiini (B-Hb), hematokriitti (B-HKR), erytrosyyttien keskitilavuus (E-MCV), hemoglobiinin keskimassa (E-MCH), hemoglobiinin keskimassakonsentraatio (E-MCHC) ja erytrosyyttien kokojakaumaprosentti (E-RDW) (EPSHP 2011a; EPSHP 2011b).

Erytrosyyttien viitearvoista poikkeava näyte (Abnormal) laukaisee sille ominaisia hälytyksiä, joiden syy täytyy tarkistaa, ennen kuin tulos voidaan hyväksyä. Erytrosyyttihistogrammin poikkeava jakauma laukaisee RBC Abn Distrib. –hälytyksen. Dimorphic population –hälytys tarkoittaa, että näytteessä on erytrosyyttien kaksoispopulaatio. Tämä aiheuttaa kaksi piikkiä erytrosyyttihistogrammiin. Anisocytosis –hälytys johtuu erytrosyyttien koon vaihtelusta, jolloin erytrosyyttihistogrammi on tavallista leveämpi. Microcytosis –hälytyksen aiheuttaa pienikokoiset erytrosyytit ($MCV < 70 \text{ fl}$) ja Macrocytosis –hälytyksen suuret erytrosyytit ($MCV > 110 \text{ fl}$). Hypochromia –hälytys tarkoittaa, että näyte sisältää hypokromisia erytrosyyttejä ($MCHC < 290 \text{ g/l}$). Erythrocytosis –hälytyksen tarkoituksena on ilmoittaa, että näytteessä on erytrozytoosia ($B\text{-Eryt} > 9,99 \text{ E12/l}$). Näistä hälytyksistä huolimatta näyte voidaan vastata. (Roche Diagnostics Oy ND.)

Epäilyshälytykset (Suspect) aiheutuvat poikkeavista erytrosyyteistä. Näytteessä oleva mahdollinen erytrosyyttien agglutinaatio aiheuttaa RBC Agglutination? –epäilyksen, jolloin näytteestä tulisi tehdä sivelyvalmiste. Iron Deficiency? –epäily aiheutuu, kun analysaattori epäilee näytteessä olevan raudanpuuteanemiaa. Epäily tulee, koska tiettyjen parametrien suhde ylittää asetetut rajat. Tulos voidaan kuitenkin vastata ilman jatkotoimenpiteitä. Näytteessä oleva mahdollinen hemoglobiinivajaus aiheuttaa HGB Defect? –epäilyksen. Tämäkin tulos on vastattavissa ilman erillisiä jatkotoimenpiteitä. Fragments? –epäily tarkoittaa, että näytteessä on mahdollisesti erytrosyyttikappaleita. (Roche Diagnostics Oy ND.)

Verenkuva-analysaattori antaa NRBC? –epäilyksen, kun näytteessä esiintyy mahdollisesti erythroblasteja. Epäily tulee, koska diffikanavasta on löydetty erythroblasteihin viittaava solupopulaatio. Verenkuva-analysaattorin antama NRBC? –epäily johtaa sivelyvalmisteen tekoon ja sen manuaaliseen mikroskopointiin. Näytteessä olevat erytrosyytit, jotka eivät hajoa reagenssikäsittelyssä, aiheuttavat RBC Lyse Resistant? –epäilyn. Epäilykseen johtaa verenkuva-analysaattorin tekemät laskelmat eri parametreja hyödyntäen. Tämän epäilyksen tullessa näytteestä saatua tulosta ei voida vastata, vaan näyte täytyy laimentaa ja ajaa uudelleen. (Roche Diagnostics Oy ND.)

2.2 Granulosyytit

Eosinofiilin, basofiilin ja neutrofiilin hematopoieesia kutsutaan granulopoieesiksi, vaikka niiden kehitys erkanee kantasolunäkökulmasta jo varhaisessa vaiheessa (Siitonen & Koistinen. 2007. 25–27; Vilpo 2010, 16). Eosinofiilin, basofiilin ja neutrofiilin muodostus alkaa myeloisesta kantasolusta CMP. Myeloisesta kantasolusta erilaistuu jokaiselle solulinjalle oma suuntautunut kantasolu, josta kypsyy kyseisen linjan soluja. (Siitonen & Koistinen 2007, 25–27; Khana-Gupta ym. 2005, 297; Hoffbrand & Moss 2011, 3.)

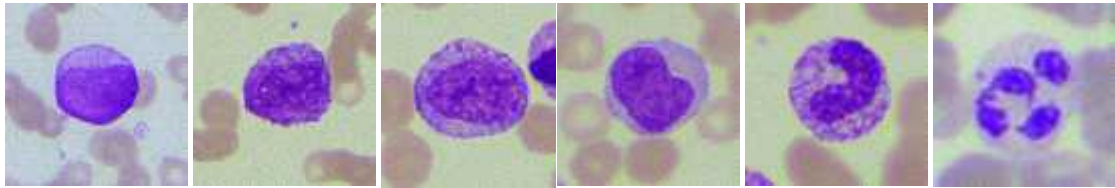
Leukosyyttihälytyksistä osa koskee kaikkia leukosyyttejä kuten Leukocytopenia –hälytys, joka tarkoittaa matalaa leukosyyttien kokonaismäärää (B-Leuk<2,5E9/l) ja Leukosytosis –hälytys, joka ilmaisee leukosyyttien korkean kokonaismäärän (B-Leuk>18E9/l). Epänormaalista leukosyyttien hajontakuviosta aiheutuu WBC Abn. Scattergram –hälytys. Näissä tapauksissa tulos voidaan vastata ilman jatkotoimenpiteitä. (Roche Diagnostics Oy ND.)

Granulosyyttilinjan soluja koskeva yhteinen epäilyhälytys on Immature Gran?-epäily, joka tarkoittaa että näytteessä on mahdollisesti epäkypsiä granulosyyttisarjan soluja. Verenkuvaa-analysointori antaa liputuksen, koska diffikanavasta on löytynyt nuoruusmuotoihin viittaava populaatio. Tässä tapauksessa näytteestä tulee tehdä sivelyvalmiste ja se täytyy mikroskopoida manuaalisesti. (Roche Diagnostics Oy ND.)

2.2.1 Neutrofiilit

Neutrofiilit, monosyytit, makrofagit ja kypsyvät samasta suuntautuneesta kantasolusta GMP (granulocyte – macrophage progenitor), jota kutsutaan myös nimellä CFU-GM (colony-forming units granulocyte-macrophage). Neutrofiilit kypsyvät suuntautuneesta kantasolusta CFU-G (colony-forming units- granulocyte), joka ei pysty muodostamaan enää muita solulinjoja. Suuntautunut kantasolu CFU-G on erilaistunut GMP –välimuodon kautta myeloisesta kantasolusta CMP (Siitonen & Koistinen 2007, 19,27; Vilpo 2010, 16; Williams 2004, 29.)

Neutrofiilien kypsyminen etenee CFU-G kantasolusta seuraavasti: myeloblasti, promyelosyytti, myelosyytti, metamyelosyytti, sauvatumainen neutrofiili ja liuskatumainen neutrofiili (kuvat 3.a, b, c, d, e, f). Liuskatumainen neutrofiili on kypsä ja on valmis siirtymään verenkiertoon. Normaalisti veressä ei esiinny sauvatumaisia neutrofiileja epäkypsempiiä muotoja. (Siitonen & Koistinen. 2007, 17, 25; Wintrobe, Lee & Boggs ym. 1981, 193–202.)



KUVA 3.a KUVA 3.b KUVA 3.c KUVA 3.d KUVA 3.e KUVA 3.f

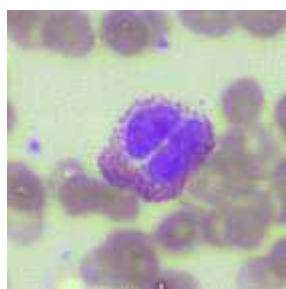
Neutrofiilin kypsyminen myeloblastista (kuva 3.a) promyelosyytiin (kuva 3.b), myelosyytiin (kuva 3.c), metamyelosyytiin (kuva 3.d) ja sauvatumaisen neutrofiilin (kuva 3.e) kautta kypsäksi liuskatumaiseksi neutrofiiliksi (kuva 3.f). (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Luuytimessä on varastoituneena neutrofiileja, joiden määrä vastaa 4-10 vuorokauden normaalia kulutusta. Tästä luuydinreservistä neutrofiileja vapautuu esimerkiksi infektiota tai muun lisääntyneen neutrofiilitarpeen vuoksi. Veressä neutrofiilit viipyvät vain noin yhden vuorokauden, jonka jälkeen ne siirtyvät eri kudoksiin, kuten suoleen, pernaan, limakalvoille, maksaan ja keuhkoihin. (Siitonen & Koistinen 2007, 27.)

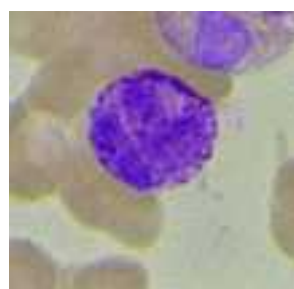
Matala neutrofiilien määrä ($B\text{-Neut} < 1,00 \times 10^9/l$) aiheuttaa Neutropenia-hälytyksen, kun taas korkeasta neutrofiilien määrästä ($B\text{-Neut} > 11,00 \times 10^9/l$) aiheutuu Neutrophilia-hälytys. Näistä hälytyksistä huolimatta verenkuvaa-analysoijan antama tulos voidaan vastata. Verenkuvaa-analysoija antaa Left Shift -epäilyksen, kun näytteessä on mahdollisesti neutrofiilien epäkypsiä muotoja, sauvatumaisia neutrofiileja. Tässä tapauksessa verenkuvaa-analysoija on löytänyt diffikanavalta nuoruusmuotoihin viittaavan löydöksen. Tämä epäily johtaa näytteestä tehdyn sivelnäytteen mikroskopointiin, ennen kuin tulos voidaan vastata. (Roche Diagnostics Oy ND.)

2.2.2 Eosinofiilit ja basofiilit

Myeloisesta kantasolusta CMP erilaistuu eosinofiilejä tuottava suuntautunut kantasolu CFU-Eo (colony-forming units- eosinophil) ja basofiilejä tuottava suuntautunut kantasolu CFU-Baso (colony-forming units- basophil) (Siitonen ym. 2007, 25–27; Khana-Gupta ym. 2005, 297). Eosinofiilin ja basofiilin kypsyminen etenee samalla tavalla kuin neutrofiilin kypsyminen: myeloblasti, promyelosyytti, myelosyytti, metamyelosyytti, sauvatumainen granulositytti ja liuskatumainen granulositytti. Myelosyyttitasolla eosinofiili-, basofiili-, ja neutrofiiliarjan solut alkavat morfologisesti erottua toisistaan. (Siitonen & Koistinen 2007, 26–27; Wintrobe ym. 1981, 193–202.) Kypsät eosinofiilit (kuva 4.a) ja basofiilit (kuva 4.b) viiptyvät vain tunteja ennen kuin ne siirtyvät kudoksiin. Eosinofiilit ja basofiilit aktivoituvat elimistön allergisissa ja tulehduksellisissa reaktioissa. Syöttösoluiksi kutsutaan kudoksissa olevia basofiilin kaltaisia soluja. (Siitonen & Koistinen 2007.)



KUVA 4.a



KUVA 4.b

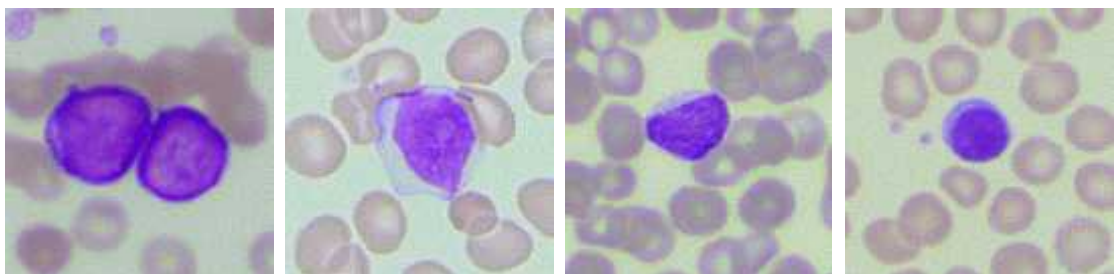
Kuvat esittävät eosinofiilia (kuva 4.a) ja basofiilia (kuva 4.b). (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Verenkuva-analysaattori antaa korkeasta eosinofiilimäärästä ($B\text{-Eos} > 0,7 \times 10^9/l$) Eosinophilia-hälytyksen. Korkeasta eosinofiilimäärästä huolimatta tulos voidaan vastata ilman jatkotoimenpiteitä. Basophilia-hälytys johtuu korkeasta basofiilien määrästä ($B\text{-Baso} > 0,2 \times 10^9/l$) näytteessä. Myös tässä tilanteessa tulos voidaan vastata. (Roche Diagnostics Oy ND.)

2.3 Lymfosyytit

Lymfopoieesi saa alkunsa kun monikykyinen hematopoieettinen kantasolu HCS erilaistuu lymfaattiseksi kantasoluksi CLP (common lymphoid progenitor). Lymfosyyttisarjan solut jaetaan T- ja B-lymfosyytteihin ja luonnollisiin tappajasoluihin. Luonnollisista tappajasoluista käytetään nimeä NK-solut (natural killer). (Siitonen & Koistinen 2007, 29; Williams 2004, 24–25.) Lymfosyyttien kehittyminen eroaa huomattavasti muiden verensolujen muodostuksesta.

B- ja T-lymfosyyttien erilaistuminen jaetaan kahteen eri osaan, antigeenistimulaatiosta riippumattomaan ja antigeenitunnistuksesta riippuvaan erilaistumiseen (Siitonen & Koistinen 2007, 29). B- ja T-lymfosyyttejä ei voida morfologisesti erottaa toisistaan May Grünwald Giemsa –värjätyistä näytteistä, sillä ne ovat rakenteeltaan samankaltaisia (Vilpo 2010, 24–25). Lymfosyytit jaetaan morfologiansa perusteella isoihin (kuva 6.c) ja pieniin (kuva 6.d) lymfosyytteihin (Wintrobe ym. 1981, 271). Lymfosyyteistä esiintyy joissain tautitiloissa myös morfologiansa perusteella tunnistettavia reaktiivisia lymfosyyttejä (kuva 7.a sivu 17) (Andersson & Poulsen 2003, 103; Itälä & Vilpo 2007, 389).



KUVA 6.a

KUVA 6.b

KUVA 6.c

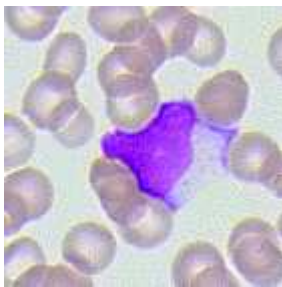
KUVA 6.d

Kuvissa esitetään lymfosyytin nuoruusmuodoista lymfoblasti (kuva 6.a) ja prolymfosyytti (kuva 6.b), sekä kypsät solut iso lymfosyytti (kuva 6.c) ja pieni lymfosyytti (kuva 6.d). (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

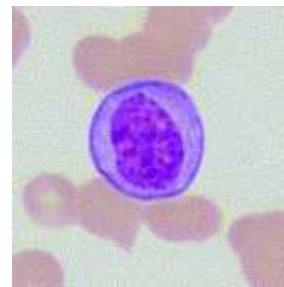
B-lymfosyytin antigeenistä riippumaton kypsyminen tapahtuu melkein kokonaisuudessaan luuytimessä. Lymfaattisesta kantasolusta on erilaistunut luuytimessä pro-B-solu, joka muuttuu edelleen pre-B-soluksi. Pre-B-solu muuttuu B-soluksi kun sen immunoglobuliinigeenit ovat järjestäytyneet oikein ja solu ilmentää pinnallaan oikeanlaisia im-

munoglobuliinimolekyyliä. (Siitonen & Koistinen 2007, 29; Dorshkind & Rawlings 2005, 120–121.)

Luuytimen ulkopuolella jatkuu antigeenistä riippuva erilaistuminen. B-solu kohtaa antigeeninsä imusolmukkeessa tai pernassa. Dendriittisolut prosessoivat vieraat antigeenit ja tuovat ne imusolmukkeeseen, jossa T-solut tunnistavat antigeenikompleksin ja aktivoituvat. Kun T-solu kohtaa B-solun, B-solu aktivoituu ja alkaa muodostaa kloonijakaantumalla. Kloonit voivat erilaistua muistisoluiksi tai plasmasoluiksi (kuva 7.b). (Siitonen & Koistinen 2007, 29-30.)



KUVA 7.a



KUVA 7.b

Kuvassa 7.a on kuvattu reaktiivinen lymfosyytti ja kuvassa 7.b plasmasolu. (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

T-lymfosyyttien erilaistuminen alkaa luuytimessä, mutta siirtyy jo varhaisessa vaiheessa kateenkorvaan. Lymfaattisesta kantasolusta erilaistuneet pro-T-solut siirtyvät luuytimestä kateenkorvan kuorikerrokseen. Pro-T-solusta kehittyy edelleen pre-T-solu ja kehittyessään se siirtyy lähemmäksi kateenkorvan ydintä. T-solun kypsyminen on pitkälti sen antigeenireseptorin kehittymistä ja erilaisten immunoglobuliinimolekyylien ilmentämistä solun pinnalla. Kateenkorvan ytimen saavutettuaan solu on kehittynyt kypsyttömäksi T-soluksi. (Siitonen & Koistinen 2007, 30–31; Clayberger & Krensky 2005, 139-143) Kateenkorvasta T-solu siirtyy pernaan ja imusolmukkeisiin, joissa se kohtaa spesifisen antigeeninsä. T-solu aktivoituu kun se tunnistaa dendriittisolun prosessoiman vieraan antigeenin. T-soluista voi tulla auttajasoluja, muistisoluja tai sytotoksisia soluja. (Siitonen & Koistinen 2007, 31.)

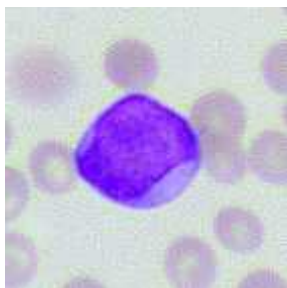
Verinäytteen matala lymfosyyttimäärä ($B-Ly < 0,8E9/l$) laukaisee Lymphopenia-hälytyksen, korkea määrä ($B-Ly > 4,0E9/l$) puolestaan aiheuttaa Lymphocytosis-hälytyksen. Kummassakin tapauksessa näytteen tulos voidaan vastata ilman jatkotoi-

menpiteitä. Abn Lympho/Blasts? -epäily johtuu siitä, että verenkuvaa-analysaattori on havainnut diffikanavasta populaation, joka viittaa verinäytteessä olevan epätyypillisiä (atyyppisiä) lymfosyyttejä tai lymfoblasteja. Kyseinen epäily johtaa sivelyvalmisteen mikroskopointiin. Atypical Lympho?-epäilyn aiheuttaa näytteessä mahdollisesti olevat epätyypilliset lymfosyytit, jotka on havaittu diffikanavalta. Tässäkin tapauksessa näyte täytyy mikroskopoida ennen tuloksen vastaamista. (Roche Diagnostics Oy ND.)

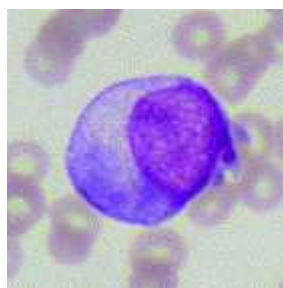
2.4 Monosyytit

Granulocyte-macrophage progenitor –solun erilaistuminen haarautuu eri solulinjoiksi, tuottaen monosyyttien lisäksi makrofageja ja neutrofiilejä. Kyseinen GMP -solu on erilaistunut myeloisesta kantasolusta CMP. Monosyytit ja makrofagit kehittyvät CFU-M (colony-forming units- myeloid) -suuntautuneesta kantasolusta. (Siitonen & Koistinen 2007, 19,27; Vilpo 2010, 16; Williams 2004, 29.)

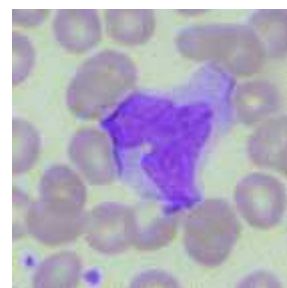
Monosyytit kypsyvät seuraavanlaisessa järjestyksessä: monoblasti, promonosyytti ja monosyytti (kuvat 2.a, b, c) (Siitonen & Koistinen 2007, 27). Monosyytit kehittyvät luuytimessä ja vapautuvat tämän jälkeen verenkiertoon noin kolmeksi päiväksi, jonka jälkeen ne siirtyvät kudoksiin. Kudoksiin siirtyminen mahdollistaa monosyyttien erilaistumisen makrofageiksi. (Siitonen & Koistinen 2007, 25; Khanna-Gupta & Berliner 2005, 296–297.)



KUVA 2.a



KUVA 2.b



KUVA 2.c

Monosyytin kypsyminen monoblastista (kuva 2.a) promonosyytin (kuva 2.b) kautta kypsäksi monosyytiksi (kuva 2.c). (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

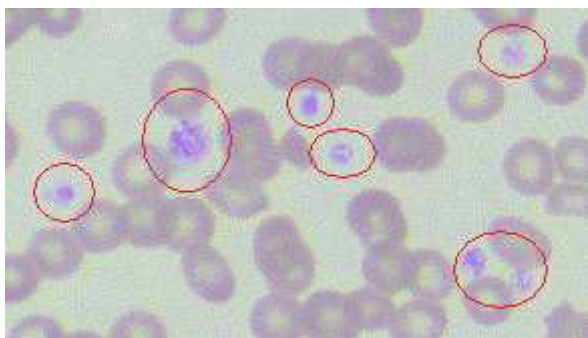
Monosyyttien hälytyksiä on Monocytosis –hälytys, joka ilmaisee näytteessä olevan korkean monosyyttipitoisuuden (B-Monos>1,0E9/l). Tässä tapauksessa tulos voidaan vastata. Epäilyshälytyksistä Blasts? –epäily koskee monosyyttejä, mutta myös kaikkia

muitakin leukosyyttejä. Blasts? –epäily tarkoittaa, että näyte sisältää mahdollisesti blasti -nuoruusmuotoja, eli diffikanavassa on havaittu tähän viittaava solupopulaatio. Tämä hälytys johtaa sivelyvalmisteen mikroskopointiin. (Roche Diagnostics Oy ND.)

2.5 Trombosyytit

Trombosyyttilinjan kehittyminen erkaneer myelosisesta kantasolusta CMP. Myeloinen kantasolu erilaistuu suuntautuneeksi kantasoluksi MEP (megakaryocyte – erythroid progenitor), toiselta nimeltään CFU-MegE (colony-forming units- megakaryocyte erythroid). Tästä erilaistuneesta kantasolusta voi myös erkaantua erytrosyyttilinja. Tämän jälkeen ovat vuorossa trombosyyttien linjaspesifiset kantasolut BFU-Meg (burst-forming units- megakaryocyte) ja CFU-Meg (colony-forming units- megakaryocyte). (Siitonen & Koistinen 2007, 19, 28; Long & Hoffman 2005, 303–304.)

Seuraavat kehitysmuodot ovat morfologisesti erottuvat megakaryoblasti, promegakaryosyytti, megakaryosyytti ja trombosyytti (kuva 5). Megakaryoblastin kypsyessä kohti megakaryosyyttiä solun kromosomisto moninkertaistuu ja sytoplasman määrä solussa lisääntyy. Solun tuma alkaa lohkoontua ja samalla tapahtuu solun granuloitumista. Megakaryosyytin pinnalle muodostuu pseudopodeja, hajotessaan pseudopodit eli valejalat vapauttavat trombosyyttejä verenkiertoon. Yksi megakaryosyytti pystyy tuottamaan noin 1000–5000 trombosyyttiä. Noin 20 – 30 % kypsistä trombosyyteistä on varastoitunut pernaan. (Siitonen & Koistinen 2007, 28–29.)



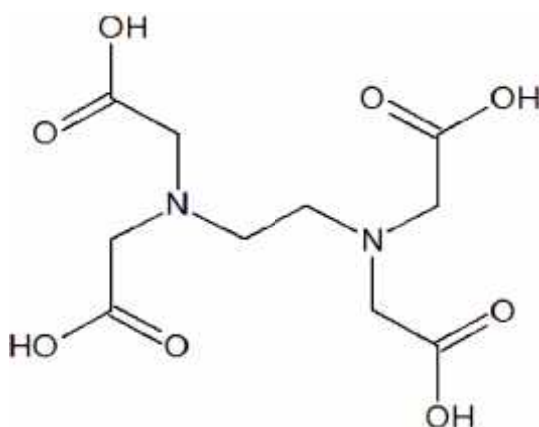
KUVA 5.

Rengastetut solut ovat trombosyyttejä (kuva 5.). (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Verenkuva-analysaattori antaa Thrombocytosis-hälytyksen, kun näytteessä on suuri määrä (B-Trom>600E9/l) trombosyyttejä. Trombosyyttien vähäinen määrä (B-Trom<60E9/l) laukaisee taas Thrombocytopenia-hälytyksen. Kummassakin hälytystapauksessa näytteen tulos voidaan hyväksyä. Verenkuva-analysaattori tuottaa PLT Abn Distrib.-hälytyksen, jos trombosyyttiärvot poikkeavat asetetuista rajoista. Hälytys tulee, koska trombosyyttihistogrammi on epänormaali. Tämän hälytyksen vuoksi näyte täytyy mikroskopoida, ennen kuin sen tulos voidaan vastata. Verenkuva-analysaattori laukaisee PLT Clumps -epäilyn, jos näytteessä on mahdollisesti trombosyyttikasoja. Epäilysliputus tulee joko diffikanavasta löytyneestä populaatiosta tai trombosyyttihistogrammin poikkeavasta muodosta. (Roche Diagnostics Oy ND.)

3 EDTA-ANTIKOAGULANTTI

Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) on ligandi, jota suositetaan antikoagulanttina verenkuvatutkimuksissa, sillä se estää hyytymisen täydellisesti ja aiheuttaa minimaalisia muutoksia solujen morfologiassa. (Perkins 2009, 1; Zumdahl 1998, 905). Etyleenidiamiinitetraetikkahapon sisältämät natrium ja kaliumsuolat ovat voimakkaita antikoagulantteja joita käytetään etenkin rutiinihematologisissa tutkimuksissa. Tästä syystä täydellinen verenkuvanäyte otetaan EDTA:ta sisältävään putkeen. (Burns 2004, 124-125; Jury, Nagai, & Tatsumi 2012, 6; Perkins 2009, 1) Etyleenidiamiinitetraetikkahapon rakennekaava on esitetty kuvassa 8.



KUVA 8. Etyleenidiamiinitetraetikkahapon rakennekaava (Mukaiillen Zumdahl 2012)

3.1 EDTA:n toimintaperiaate

Etyleenidiamiinitetraetikkahappo estää veren hyytymisen kelatoimalla kalsiummolekyylejä, jotka ovat keskeisiä komponentteja hyytymiskaskadissa. Kelaatio tapahtuu, kun EDTA-molekyyli muodostaa koordinaatiosidoksen metalli-ionin kanssa estäen näin kyseisen metalli-ionin toiminnan. (Banfi ym. 2007, 565-576; Zumdahl 1998, 905) Ihanteellisen kelatoivan reaktion aikaansaamiseksi tulee EDTA:n ja veren konsentraation olla Juryn mukaan 1.2mg/1ml, Clinical and Laboratory Standards – instituutin (CLSI) mukaan 1.5mg-2.2mg/1ml ja Burnsien mukaan 1.5mg/1ml (Burns 2004, 124-125; Clinical and Laboratory Standards 1993, 371; Jury ym. 2012, 6.)

Dikaliumsuola (K2) on erittäin liukeneva (1650g/l) ja sen takia sitä suositaan enemmän kuin dinatriumsuoloja, jotka liukenevat huomattavasti huonommin (108g/l). Putken sisäpintojen pinnoittaminen EDTA:lla parantaa antikoagulantin sekoittumista vereen. Nestemäisessä muodossa oleva trikaliumsuola laimentaa hieman verta ja kutistaa erytrosyyttejä. Seurauksena on 2 – 3 % pieneneminen hematokriittiarvossa neljän tunnin sisällä näytteenotossa. Tätä seuraa asteittainen erytrosyyttien koon nousu. (Jury ym. 2012, 6.) Phillips ym. (1998, 17-20) sekä Goossens, Van Duppen ja Verwilghen (1991, 291-295) tekemän tutkimuksen mukaan nestemäisen trikaliumsuolan (K3) ja kuivamuotoisen dikaliumsuolan välillä ei ole huomattavia eroja optimaalisissa mittausolosuhteissa.

3.2 Preanalyttisten tekijöiden vaikutus

Suolasta riippumatta liian suuri EDTA-konsentraatio aiheuttaa muutoksia sekä erytrosyyteissä että leukosyyteissä. Se aiheuttaa niissä kutistumista ja degeneratiivisia muutoksia. Yli 2mg/l konsentraatio saattaa nostaa erytrosyyttien keskimääräistä hemoglobiinikonsentraatiota. Tämän lisäksi trombosyytit turpoavat ja hajoavat, joka johtaa virheellisen korkeaan trombosyyttiin arvoon, koska fragmentit ovat tarpeeksi isoja laskettavaksi mukaan trombosyyttien kokonaismäärään. (Burns 2004, 124-125; Jury ym. 2012, 6.) Korkea EDTA-pitoisuus saattaa aiheuttaa myös trombosyyttien aggregoitumista kasoiksi, jota kutsutaan pseudotrombosytopeniaksi tai ne saattavat tarttua neutrofiileihin, jolloin ilmiötä kutsutaan trombosyyttisatellitismiksi (Savolainen 2007, 86; Mahlamäki 2004, 268-269).

Riittämätön EDTA-konsentraatio saattaa johtaa pieniin hyytymiin ja tuottaa virheellisen alhaisia solujakaumia. Vakuumputket, jotka täyttyvät tiettyyn tilavuuteen ja jotka sisältävät halutun määrän EDTA:ta, minimoivat näitä virheitä. Etyleenidiamiinitetraetikkahapon tärkeä etu on sen hyvä liukeneminen vereen ja se toimii näytteessä melkein välittömästi. (Wintrobe ym. 1981, 9.)

Lisäaineita sisältäviä veriputkia pitää aina sekoittaa ennen määrittäksiä (Jury ym. 2012, 6; Lippi, Salvagno, Montagnana, Banfi & Guidi 2007, 723.) Clinical and Laboratory Standards -instituutin ohjeistuksen mukaan (1993, 371-372) veriputkia pitää sekoittaa 5-10 kertaa ennen määrittästä. Näin varmistetaan sekä antikoagulantin sekoittuminen näytteeseen että hyytymien muodostumisen estäminen (Clinical and Laboratory

Standards Institute 1993, 371–372). Lippi ym. (2007, 723-725) mukaan sekoitettujen näytteiden ja sekoittamattomien näytteiden tulosten välillä on eroja. Sekoittamattomissa näytteissä todettiin erytrosyyttien, hematokriitin, hemoglobiinin ja trombosyyttien laskua kuusi kertaa sekoitetuista näytteistä saatuihin tuloksiin verrattuna. Sekoittamattomista näytteiden tuloksista yksikään ei tosin eronnut sallittua rajaa enempää kuusi kertaa sekoitettujen näytteiden tuloksista. (Lippi ym. 2007, 723-725.)

3.3 Ajan vaikutus EDTA-verinäytteen säilyvyyteen

On osoitettu, että EDTA aiheuttaa myös leukosyyttien agglutinaatiota, varsinkin neutrofiilien ja lymfosyyttien kohdalla. Leukosyytti- ja trombosyyttiarvot sekä erytrosyyttien kokonaismäärä, että erytrosyytti-indeksit ovat yleensä stabiileja kahdeksaan tuntiin asti näytteenotosta huoneenlämmössä säilytettynä. Tämän ajan jälkeen erytrosyytit alkavat turvota ja näin nostavat hematokriittiä (HCT) ja erytrosyyttien keskitilavuutta. Veriputkia voidaan säilyttää jääkaapissa yön yli, kunhan varmistetaan että putket eivät pääse jäätymään. (Jury ym. 2012, 6-7)

Juryn ym. (2012, 7) ja Savolaisen (2007, 87) mukaan leukosyyttien määrä laskee muutaman tunnin päästä näytteenotosta, varsinkin jos EDTA-konsentraatio on liian suuri. Lisäksi Juryn ym. (2012, 7) mukaan yli 24 tunnin jääkaappisäilytyksen jälkeen leukosyyttien erottelulaskennan tulokset eivät ole enää luotettavia. Retikulosyyttiarvot pysyvät muuttumattomina 24 tunnin ajan jääkaappisäilytyksessä, mutta huoneenlämmössä ne laskevat jo kuuden tunnin jälkeen. Tumalliset erytrosyytit häviävät näytteestä 1-2 vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Hemoglobiinikonsentraatio pysyy muuttumattomana vuorokausien ajan, kunhan veri ei pääse infektoitumaan. Kun näytteenotosta on kulunut 2-3 vuorokautta, näytteessä oleva veri alkaa hajoamaan, joka johtaa erytrosyyttien määrän ja hematokriitin laskuun sekä MCH:n ja MCHC:n nousuun. (Jury ym. 2012, 7; Savolainen, 2007, 87.)

Tutkimuksia, joissa tutkittiin joko kaikkia tai osaa täydellisen veren kuvan parametrien säilyvyydestä EDTA-putkissa, löytyi useita. Cohle, Saleem ja Makkaoui (1981, 67-69) ovat julkaisseet tutkimuksen, jossa tutkittiin miten leukosyytit, hemoglobiini, erytrosyytit, MCV, MCHC, MCH ja trombositit säilyvät, jos niitä säilyttää kolme vuorokautta +4 °C jääkaappilämpötilassa tai huoneenlämmössä. Tutkimuksessa selvisi,

että kolmen vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen MCV nousee huomattavasti ja myös MCHC:ssa, sekä hematokriitissä oli havaittavissa muutoksia. Jääkaappilämpötilassa säilytettyjen näytteiden parametreissa ei tapahtunut huomattavia muutoksia kolmen vuorokauden säilytyksen jälkeen.

de Baca, Gulati, Kocher ja Schwarting (2005, 28-36) tutkivat, miten täydellisen veren kuvan parametrit säilyvät, jos näytteitä säilytetään viisi vuorokautta huoneenlämmössä. de Bacan ym. (2005, 28-36) tekemän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, ovatko täydellisen veren kuvan tulokset enää luotettavia pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Tutkimuksessa mitattiin yhteensä 40 K2-EDTA-verinäytettä. Näitä näytteitä säilytettiin huoneenlämmössä ja ne mitattiin kerran vuorokaudessa viiden vuorokauden ajan. Näytteet mitattiin Sysmex[®] XE-2100 -analysaattorilla. Tutkimuksessa havaittiin muutoksia MCV:ssä, MCHC:ssä, hematokriitissä ja RDW:ssä jo vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Näistä MCHC laski ja hematokriitti, RDW sekä MCV kohosivat. Kahden vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen analysaattori ei joko ilmoittanut ollenkaan tuloksia leukosyyttien erittelylaskennasta tai se antoi tulokset epäluotettavasti. Tutkimuksessa selvisi myös, että leukosyyttien kokonaismäärä, erytrosyytit, hemoglobiini, MCH ja trombosyytit pysyivät stabiileina neljänteen vuorokauteen asti. Tutkimuksen mukaan joistain täydellisen veren kuvan parametreista saadaan luotettavia tuloksia kolmen vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen, mutta osaan saaduista tuloksista pitää suhtautua varauksella. (de Baca ym. 2005, 28-36.)

Sama tutkimusryhmä julkaisi kolme vuotta aikaisemmin tutkimuksen, jonka tavoitteena oli selvittää, mitkä täydellisen veren kuvan parametrit muuttuvat pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen (Gulati, Hyland, Kocher & Schwarting 2002, 336-342). Tutkimuksessa käytettiin Coulter[®] Gen.S -analysaattoria. Tutkimukseen valittiin 40 kappaletta verinäytteitä ja antikoagulanttina käytettiin nestemäistä K3-EDTA:ta. Näytteet mitattiin 24 tunnin välein seitsemään vuorokauteen asti. Vaikka analysaattori ja käytetty antikoagulantti eivät olleet samoja kuin tutkimusryhmän myöhemmässä tutkimuksessa, tulokset olivat kauttaaltaan samansuuntaiset: erytrosyyttiparametreista MCV:n, MCHC:n, hematokriitin ja RDW:n tulokset muuttuivat jo vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Muiden erytrosyyttiparametrien tulokset pysyivät stabiileina vähintään seitsemän vuorokautta. Leukosyytit ja trombosyytit pysyivät vakaina neljänteen vuorokauteen asti, mutta erittelylaskennassa monosyyttien määrä

laski ja neutrofiilien, lymfosyyttien sekä eosinofiilien määrä nousi. Tutkimuksessa todettiin, että täydellisen verenkuvan tulokset ovat hyväksyttävissä pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen tietyin rajoituksin, riippuen säilytyksen kestosta. (Gulati ym. 2002, 336-342.)

Lippi, Salvagno, Solero, Franchini ja Guidi julkaisivat vuonna 2005 tutkimuksen, jossa tutkittiin täydellisen verenkuvan parametrien säilyvyyttä vuorokauden huoneenlämpö- ja +4 °C jääkaappisäilytyksen jälkeen (Lippi ym. 2005, 333-340). Kyseisessä tutkimuksessa vertailtiin miten 21:n eri täydellisen verenkuvan parametrin tulokset vaihtelevat huoneenlämpösäilytyksessä ja jääkaappisäilytyksessä olleiden näytteiden välillä. Vuorokauden ajan huoneenlämmössä ja jääkaapissa säilytettyjen näytteiden välillä huomattiin vaihtelua seuraavissa parametreissa: MCV, MCHC, hematokriitti ja trombosyytit. Huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden tulokset vaihtelivat huomattavasti jääkaapissa säilytettyjä näytteitä enemmän. Muissa parametreissa ei todettu huomattavaa muutosta. (Lippi ym. 2005, 333-340.)

Kolme vuotta myöhemmin Imeri ym. (2008, 68-71) tutkivat miten täydellisen verenkuvan parametrit säilyvät, jos näytettä säilytetään huoneenlämmössä tai +4-8 °C jääkaappilämpötilassa kolmen vuorokauden ajan. Näytteille suoritettiin myös välimittauksia. He analysoivat samat näytteet joka mittausajankohdassa kolmella eri analysaattorilla ja vertailivat eri analysaattorien antamia tuloksia toisiinsa. Jokaiselle huoneenlämmössä säilytetylle näytteelle oli myös samasta potilaasta otettu toinen näyte, jota säilytettiin yhtä kauan jääkaappilämpötilassa. Näytteet analysoitiin 72 tunnin kuluttua näytteenotosta ja tietyin väliajoin ennen viimeistä mittausta Bayer Diagnostics® Advia 120A, Beckman Coulter® LH 750 ja Sysmex® XE-2100 -analysaattoreilla. Tutkimuksen mukaan MCV, hematokriitti ja leukosyytit säilyvät paremmin jääkaappilämpötilassa. Trombosyytit säilyivät paremmin huoneenlämmössä kuin jääkaappilämpötilassa. Tutkituista parametreista MCH, hemoglobiini ja erytrosyyttien määrä säilyivät vähintään kahden vuorokauden ajan stabiileina huoneenlämmössä säilytettynä, käytetystä analysaattorista riippuen. Leukosyyttien erittelylaskennassa huomattiin suuria eroja analysaattoreiden välillä kolmen vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen.

Näiden tutkimusten lisäksi on tehty samantyyppisiä tutkimuksia joissa on ihmisen verinäytteen sijaan tutkittu eläinten verinäytteitä. Näitä ovat esimerkiksi Médailien, Briend-Marchalin ja Braunin (2006, 18-23) julkaisema tutkimus koiran täydellisen veren kuvan säilyvyydestä huoneenlämmössä sekä Hadzimusicin, Katican, Muharemovicin ja Mušanovicin (2010, 158-166) julkaisema tutkimus kalkkunan täydellisen veren kuvan säilyvyydestä huoneenlämmössä. Vaikka nämä kaksi ovat eläinlääketieteeseen liittyviä tutkimuksia, niistä saatiin kuitenkin saman suuntaisia tuloksia, kuin aiemmin mainituista tutkimista. Kummassakin tutkimuksessa todettiin, että MCV kohoaa pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen erytrosyyttien ja leukosyyttien määrän pysyessä lähes muuttumattomana. (Hadzimusic ym. 2010, 158-166; Médaille ym. 2006, 18-23).

Kaikissa edellä mainituissa tutkimuksissa huomattiin, että MCV kohoaa erytrosyyttien määrän sekä leukosyyttien määrän pysyessä lähes muuttumattomana pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen, riippuen huoneenlämpösäilytyksen kestosta. Jokaisessa tutkimuksessa todettiin myös, että täydellisen veren kuvan parametrit säilyvät paremmin jääkaappilämpötilassa kuin huoneenlämmössä, lukuun ottamatta Imerin ym. (2008, 68-71) tutkimusta jonka mukaan trombositit säilyvät paremmin huoneenlämmössä. Jokaisessa tutkimuksessa, jossa määritettiin myös hematokriitti, MCHC ja RDW huomattiin muutoksia näiden parametrien tuloksissa pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Näistä hematokriitti ja RDW kohosivat ja MCHC laski. (Cohle ym. 1981, 67-69; de Baca ym. 2005, 28-36; Imeri ym. 2008, 68-71; Gulati ym. 2002, 336-342; Lippi ym. 2005, 333-340.)

4 SYSMEX® XE-5000 VERENKUVA-ANALYSAATTORI

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian laboratoriossa on kaksi Sysmex® XE-5000 –analysaattoria (kuva 9). Analysaattoreita käytetään myös päivystysaikana. Analysaattorissa on kaksi eri mittauspuolta, avo- ja suljettu puoli. Avopuolella jokainen näyte määritetään yksitellen. Suljetulla puolella käytetään näytetelinettä, johon mahtuu kerrallaan kymmenen näytettä. Avopuolelta analysaattori aspiroi 130µl näytettä ja suljetulta puolelta 200µl näytettä. Näyte laimennetaan aspiroinnin jälkeen ja analysaattori lähettää sen valitun tutkimuksen mukaan mittauskanaville. Analysaattori määrittää leukosyytit sekä WBC/BASO- että 4DIFF -kanavilla, erytroblastit NRBC -kanavalla, retikulosyytit ja trombositit RET/PLT-O -kanavalla, epäkypsät granulositit IMI-kanavalla ja hemoglobiinin HGB -kanavalla. Trombosyyttien määrittämiseen käytetään myös RBC/PLT-kanavaa, jota käytetään myös erytrosyyttien määrittämiseen. Mittauskanavat käsitellään tarkemmin reagenssien yhteydessä Sysmex® XE 5000:n reagenssit, kontrollit ja niiden säilytys -kappaleessa. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-14, 11-15; Kuusela 2011.)

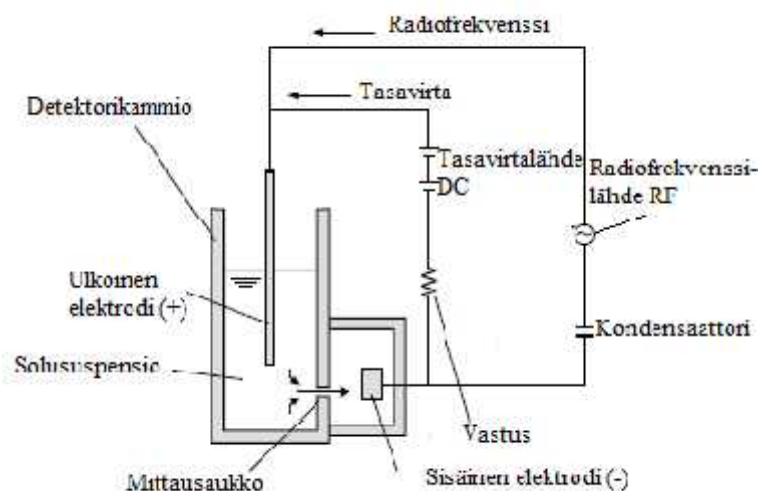


KUVA 9. Sysmex® XE-5000 –analysaattori (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Sysmex[®] XE-5000 käyttää solujen laskemiseen ja tunnistamiseen radiofrekvenssi/tasavirta -menetelmää (RF/DC), hydrodynaamista fokusointia, puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometriaa sekä natriumlauryylisulfaatti eli SLS-hemoglobiini -menetelmää. Radiofrekvenssi/tasavirtadetektion avulla tunnistetaan solujen koko ja solujen sisäosien tiheys (mm. tuman koko). Hydrodynaamisen fokusoinnin avulla analysaattori laskee solujen määrän ja sitä käytetäänkin tasavirtadetektiossa ja puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometriassa. Virtaussytometrialla analysoidaan solujen fysiologiset ja kemialliset ominaisuudet, kuten esimerkiksi ribonukleiinihapon eli RNA:n ja deoksiribonukleiinihapon eli DNA:n määrä. Natriumlauryylisulfaatti-hemoglobiini- eli SLS-hemoglobiini -menetelmällä analysoidaan näytteen hemoglobiinin määrää. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-13.)

4.1 Radiofrekvenssi/tasavirtadetektio (RF/DC)

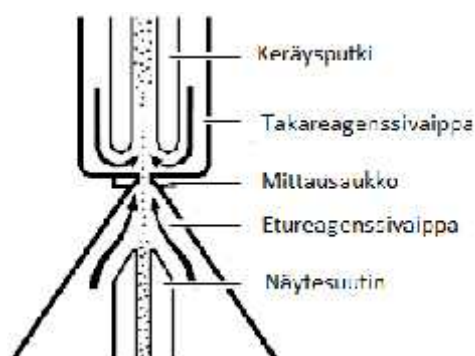
Verisolujen koko tunnistetaan detektioalueen läpi kulkevan tasavirran vastuksen muutoksista ja solujen sisäosien tiheys tunnistetaan radiofrekvenssin vastuksen muutoksista. Tunnistus kulkee seuraavalla tavalla: analysaattorilla aspiroidaan verinäyte, mitataan ja laimennetaan se tiettyyn suhteeseen, jonka jälkeen tämä laimennettu näyte kuljetetaan sopivaan detektiokammioon. Detektiokammiossa on aukko, jonka kummallakin puolella on elektrodi. Elektrodien välillä kulkee tasavirta ja radiofrekvenssi. Verisolut on laimennettu Cellpack -laimennosliuokseen ja ne kulkevat aukon läpi vaihtaen samalla tasavirran ja radiofrekvenssin vastuksia elektrodien välillä. Detektio tapahtuu sähköimpulssien muodossa. Näiden impulssien suuruuteen perustuen laite pystyy piirtämään kaksiulotteisen jakauman eli sirontakuvion (engl. scattergram) solujen koosta ja sisäosien tiheydestä. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-11.) Radiofrekvenssi/tasavirtadetektiokammion rakenne ja mittausperiaate käsitellään tarkemmin kuvassa 10 sivulla 29.



KUVA 10. Radiofrekvenssi/tasavirtadetektioikammion rakenne ja mittausperiaate (Mukaillen Sysmex Europe GMBH 2008)

4.2 Hydrodynaaminen fokusointi

Detektorin sisällä on näytesuutin, joka on asetettu detektorin aukon eteen keskelle. Näyte pakotetaan näytesuuttimesta ulos ja se ympäröidään etureagenssivaipalla joka on lievän paineen alla. Etureagenssivaippa pakottaa näytteen partikkelit kulkemaan yksitellen yhdessä jonossa kartiomaisen mittausaukon läpi. Tämä pienentää satunnaishävikkiä ja vaihtelevia sähköimpulsseja ei-aksiaalisen virtauksen vuoksi. Kun partikkelit ohittavat mittausaukon, takareagenssivaippa tempaisee ne mukaansa keräysputkeen. Tämä estää partikkelien virtaamisen takaisin aukon läpi eliminoiden takaisinvirtauksen aiheuttamat mittausvirheet. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-11; Automated Hematology Analyzer XE-2100.) Hydrodynaamisen fokusoinnin periaate on esitetty kuvassa 11.

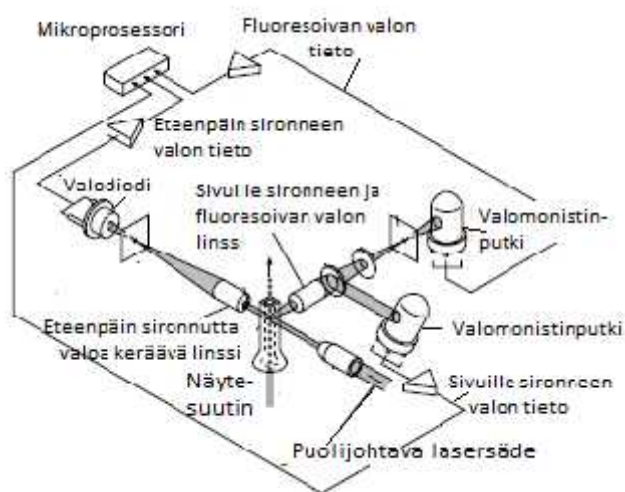


KUVA 11. Hydrodynaamisen fokusoinnin periaate. (Mukaillen Sysmex Europe GMBH 2008)

4.3 Puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometria

Puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometriassa solut ja partikkelit ohittavat erittäin pienen ja herkän detektioalueen. Puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometria mittaa tämän detektioalueen ohi kulkeneiden solujen leimatuista nukleiinihapoista tapahtuvaa valon emissiota. Näin analysaattori pystyy erottamaan solupopulaatiot ja ilmoittamaan ne sirontakuvioiden muodossa. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-12.)

Näyte kulkee mittausalueelle niin, että ensin näyte aspiroidaan, mitataan, laimennetaan sekä leimataan. Tämän jälkeen analysaattori syöttää näytteen virtauskammioon, jossa solut kulkevat yksitellen sen läpi hydrodynaamista fokusointia hyväksikäyttäen. Virtauskammioon kulkeviin soluihin kohdistetaan puolijohtava lasersäde. Lasersäde hajoaa soluihin osuessaan, siroten kaikkiin suuntiin. Sysmex[®] XE-5000 mittaa eteenpäin ja sivuille sironneen valon. Valodiodi kerää eteenpäin sironneen valon, kun taas valomonistimen putket keräävät sivuille sironneen valon ja fluoresoivan valon. Valo muuttetaan sähköimpulsseiksi jonka analysaattori pystyy mittaamaan ja muuttamaan sirontakuvioksi. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-12.) Puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometrikammion rakenne ja menetelmän periaate on esitetty kuvassa 12.



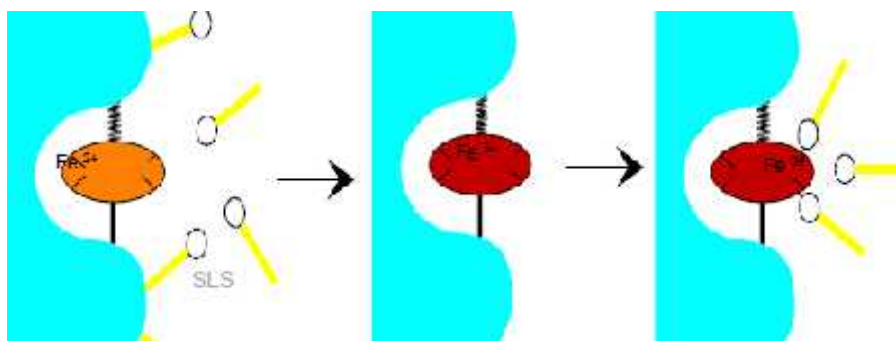
KUVA 12. Puolijohdelaserfluoresenssivirtaussytometrikammion rakenne ja kyseessä olevan menetelmän periaate. (Mukaillen Sysmex Europe GMBH 2008)

4.4 Eteenpäin ja sivuille sironnut sekä fluoresoiva valo

Sironnutta valoa detektoimalla on mahdollista saada tietoa solun koosta, rakenteesta ja sisällöstä. Siroavan valon voimakkuus riippuu eri tekijöistä, kuten partikkelin halkaisijasta. Mitä liuskoittuneempi tuma on, ja mitä enemmän solu on granuloitunut, sitä enemmän valoa siroaa sivuille. (Automated Hematology Analyzer XE-2100.) Eteenpäin sironneesta valosta saadaan tietoa solun koosta ja sivuille sironneesta valosta saadaan tietoa solujen rakenteesta. (Sysmex, 2007, 11-12; Briggs & Bain, 2012, 38). Solut on merkattu metiinillä, joka tarttuu solun nukleiinihappoihin, jonka jälkeen näihin soluihin kohdistetaan lasersäde. Fluoresoivan valon voimakkuus kasvaa solujen nukleiinihappopitoisuuden kasvaessa. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-13; Automated Hematology Analyzer XE-2100.)

4.5 Natriumlauryylisulfaatti-hemoglobiinin menetelmä

Sysmex[®] XE-5000 käyttää hemoglobiinin mittaamiseen syanidivapaata SLS-hemoglobiinin menetelmää. Mittauksessa käytettävässä reagenssissa on natriumlauryylisulfaattia eli SLS:ää ($C_{12}H_{25}SO_4Na$), jossa on sekä hydrofiilinen, että hydrofobinen osa. Hydrofobinen osa tarttuu kiinni globiinimolekyylisiin. Kun molekyyli denaturoituu, Fe^{2+} muuttuu Fe^{3+} :ksi. Hydrofiilinen osa tarttuu tämän jälkeen tähän rautaioniin muodostaen SLS-hemoglobiiniryhmän, jonka määrä on suoraan verrannollinen näytteen absorbanssiin. (Sysmex Europe GMBH 2008, 11-13; Kuusela, 2011.) Natriumlauryylisulfaatti-hemoglobiinin menetelmän periaate on esitetty kuvassa 13.



KUVA 13. Natriumlauryylisulfaatti-hemoglobiinin menetelmän periaate (Kuusela, 2011)

4.6 Sysmex® XE 5000:n reagenssit, kontrollit ja niiden säilytys

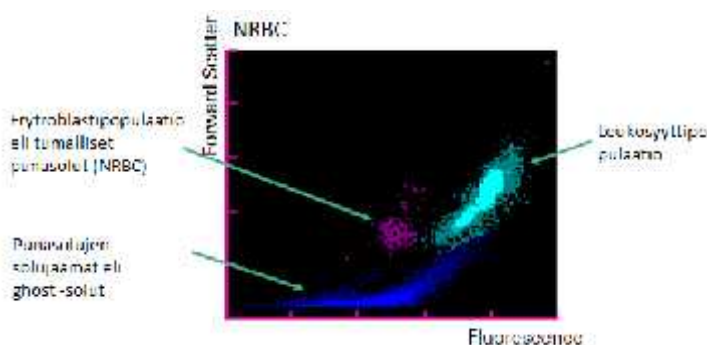
Cellpackia® käytetään näytteen laimentamiseen. Se on reagenssi, jota käytetään solujen määrän ja koon mittaukseen muiden reagenssien läsnäollessa. Cellpackia® käyttäen voidaan myös mitata hemoglobiinikonsentraatiota, kun siihen lisätään lysoivaa reagenssia (Sulfolyser®) ennen mittausta. Cellpackia® säilytetään +5 - +30 °C -lämpötilassa auringonvalolta suojattuna. Reagenssi voidaan myös pakastaa ja sulattaa yhden kerran. Avaamattomana reagenssi säilyy vanhenemispäivään asti, avattuna kaksi kuukautta. (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-1.)

Cellsheath® -liuosta käytetään suojaliuoksena (sheath-liuoksena). Cellsheathia® käytetään yhdessä muiden reagenssien kanssa erytrosyyttien ja trombosyyttien mittaamiseen tasavirtadetektiolla. Reagenssia säilytetään samalla tavalla kuin Cellpackia® eli +5 - +30 °C -lämpötilassa auringonvalolta suojattuna. Säilymisajat ovat samat kummallakin reagenssilla. (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-1.)

Lysoivaa reagenssia Stromatolyser® 4DL käytetään erittely- eli DIFF-kanavalla yhdessä värjäysreagenssin eli Stromatolyser® 4DS:n kanssa leukosyyttien luokitteluun virtaussytometriaa käyttäen. Lysoiva reagenssi Stromatolyser® 4DL aiheuttaa erytrosyyttien, sekä trombosyyttien hajoamisen ja se heikentää leukosyyttien solukalvoja. Stromatolyser® 4DS:ssä oleva fluoresoiva väriaine kulkeutuu vahingoittuneeseen leukosyyttiin ja sitoutuu nukleiinihappoihin ja sytoplasman sisäisiin rakenteisiin. Kun lasersäde kohdistetaan soluun, fluoresoivan valon voimakkuus on suhteellinen solun nukleiinihapon määrään. Stromatolyser® 4DL:ssä oleva orgaaninen happo sitoutuu spesifisesti eosinofiilien granuloihin ja mahdollistaa niiden erottamisen neutrofiileistä suuremman sivusironnan takia. Stromatolyser® 4DL ja 4DS säilyvät avaamattomana +2 - +35 °C -lämpötilassa pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään. Avattuna Stromatolyser® 4DL säilyy kaksi kuukautta ja 4DS kolme kuukautta (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-2, 4-3; Automated Hematology Analyzer XE-2100; Kuusela 2011.)

Lysoivaa reagenssia Stromatolyser® NR (L) ja leimaavaa reagenssia Stromatolyser® NR (S) käytetään analysoitaessa näytteen erytroblastit erytroblasti- eli NRBC-kanavalla. Nämä reagenssit mahdollistavat myös erytroblastien kokonaismäärän laskemisen suhteessa muiden solujen kokonaismäärään. Stromatolyser® NR (S) hajottaa erytrosyyttien solukalvoja, jättäen vain tumallisten erytrosyyttien eli erytroblastien tumat jäljelle. Leu-

kosyyttien solukalvot eivät heikkene, joten niiden sytoplasma säilyy ennallaan. Stromatolyser[®] NR (S) -reagenssin fluoresoiva väriaine tunkeutuu leukosyyttien solukalvoihin ja leimaa sytoplasman sisäiset rakenteet. Näin muodostuu kaksi selvästi erilaista solupopulaatiota fluoresoivan valon erilaiseen voimakkuuteen perustuen. Eteenpäin siroavan valon voimakkuuden perusteella voidaan selvästi erottaa tumalliset solut varjosoluista (engl. ghost cells) eli erytrosyyttien solujäämistä. Mitä enemmän solussa on nukleiinihappoja, sitä suurempi fluoresoivan valon voimakkuus sillä on sirontakuvion X-akselilla. Mitä suurempi solu on, sitä suurempi eteenpäin siroavan valon voimakkuus on sirontakuvion Y-akselilla. Erytroblastit erottuvat leukosyyteistä, koska niistä on poistettu kaikki muu paitsi tuma. Näin ollen ne värjäytyvät huonommin kuin leukosyytit. Stromatolyser[®] NR (L) ja NR (S) säilyvät avaamattomana +2 - +35 °C -lämpötilassa pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti tai avattuna kaksi kuukautta (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-3, 4-5; Automated Hematology Analyzer XE-2100.) Kuvassa 14 on esimerkki NRBC-kanavan sirontakuvioista



KUVA 14. NRBC-kanavan sirontakuviosta näkyy, miten Stromatolyser[®] NR -reagenssien avulla saadaan näkyviin näytteessä oleva erytroblastipopulaatio (Mukaillen Kuusela, 2011)

Lysoivaa reagenssia Stromatolyser[®]-IM käytetään IMI-kanavalla (Immature Myeloid Information -channel) epäkypsien solujen tunnistamiseen RF/DC-menetelmällä. Epäkypsissä granulosyyttisarjan soluissa on pienempi määrä kolesterolia, sekä niiden fosfolipideissä on suurempi suhde fosfatidyylikoliinia ja pienempi suhde sfingomyeliiniä kuin kypsissä granulosyyteissä. Analysaattori käyttää IMI-kanavalla näitä eroja hyväksi epäkypsien granuloosien sarjan solujen ja kypsien granulosyyttien erottelussa. (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-5; Automated Hematology Analyzer XE-2100.)

Näytteen kypsien granulosityttien solukalvo vahingoittuu, kun se joutuu kosketuksiin Stromatolyser[®]-IM -reagenssin kanssa. Reagenssi sisältää mm. polyeteenioksidia, rikkipitoista aminohappoa ja kationista pinta-aktiivista ainetta. Tämän johdosta kypsien granulosityttien tumat paljastuvat ja solun sisäosien komponentit eluoituvat. Myös epäkypsien granuloosien sarjan solujen solukalvot vahingoittuvat, mutta ennen kuin solujen sisäosat ehtivät eluoitumaan, reagenssissa oleva polyeteenioksidi ja rikkipitoinen aminohappo pääsevät solun sisään ja korjaavat sekä solukalvon että solun sisäosien komponentit. (Automated Hematology Analyzer XE-2100.)

Kun rikkipitoinen aminohappo on korjannut solun sisäosien komponentit, se toimii solukalvon suojana pinta-aktiivisen aineen toimintaa vastaan. Erityyppiset epäkypsät granuloosien sarjan solut reagoivat eri tavalla reagenssiin, joten tästä johtuen ne näkyvät IMI-scattergrammissa selkeästi omissa alueissaan. Näin voidaan erottaa blastit leukosyyteistä. Samalla voidaan erottaa epäkypsät granulositytit vasemmalle siirtyneistä neutrofiileistä. Stromatolyser[®]-IM säilyy +2 - +35 °C -lämpötilassa pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti avaamattomana tai avattuna kaksi kuukautta (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-5; Automated Hematology Analyzer XE-2100.)

Laimenninta RET-Search[®] (II) käytetään RET-kanavalla retikulosyyttien analysoimiseen, sekä trombosityttien optiseen tunnistukseen virtaussytometriaa käyttäen. Reagenssissa on kaksi osaa, laimennin ja leimaava liuos. Leimaavassa liuoksessa on kaksi eri leimaa, polymetiini ja oksatsiini. Nämä kaksi leimaa tunkeutuvat solun sisään leimaten retikulosyyttien RNA:n ja tumallisten solujen RNA:n ja DNA:n. Retikulosyytit erotetaan kypsistä erytrosyyteistä RNA:n määrän perusteella ja tumallisista soluista RNA:n ja DNA:n määrän perusteella. (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-5; Automated Hematology Analyzer XE-2100; Kuusela, 2011.)

Mitä suurempi määrä solussa on nukleiinihappoa, sitä suurempi on sen fluoresenssisignaali sirontakuvion X-akselilla. Mitä suurempi solu on, sitä suurempi on sen eteenpäin sironneen valon signaali Y-akselilla. Retikulosyytit eritellään kolmeen eri osaan RET-scattergrammissa niiden fluoresoivan valon intensiteetin perusteella: HRF (High-Fluorescence Ratio, korkea fluoresenssisignaali), MRF (Medium-Fluorescence Ratio, keskiverto fluoresenssisignaali) ja LFR (Low-Fluorescence Ratio, matala fluoresenssisignaali). Mitä korkeampi signaali, sitä enemmän solussa on RNA:ta. Leukosyytit eivät mahdu kuvaajaan niiden korkean fluoresenssisignaalin vuoksi. Laimennin RET-Search[®] (II) säilyy avaamattomana +5 - +35 °C -lämpötilassa pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti tai avattuna kaksi kuukautta (Automated Hematology Analyzer XE-2100; Kuusela, 2011.)

Stromatolyser[®] FB (II) -reagenssia käytetään leukosyytti- ja basofiili -kanavalla (WBC/BASO) basofiilien ja muiden leukosyyttien määrän laskemiseen virtausytometriä käyttäen. Reagenssin hapan pinta-aktiivinen aine hajottaa erytrosyytit ja trombosyytit ghost-soluiksi. Reagenssi paljastaa leukosyyttien tumat basofiilejä lukuunottamatta. Basofiilit näkyvät sirontakuviossa omana populaationaan, koska niiden solukalvo on pysynyt ehjänä. Tämän vuoksi niiden sekä eteenpäin että sivuille sironneen valon voimakkuus on suurempi kuin ghost-soluilla ja tumallisten solujen tumajäämillä. Stromatolyser[®] FB (II) säilyy avaamattomana +5 - +35 °C -lämpötilassa pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti tai avattuna kaksi kuukautta (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-2; Automated Hematology Analyzer XE-2100.)

Lysoiva reagenssi Sulfolyser[®] on syanidivapaa ja sitä käytetään hemoglobiinin määrittämiseen yhdessä laimentimen kanssa. Reagenssi hemolysoi ensin erytrosyytit, jonka jälkeen niiden globuliinimolekyylin rakenne muuttuu ja rauta hapettuu. Reagenssissa olevan SLS:n hydrofiilinen osa tarttuu kiinni muuttuneeseen rautaioniin muodostaen SLS-hemoglobiiniryhmän. Mitattavan SLS-hemoglobiinin maksimiabsorbanssi on 535nm ja se mitataan fotometrisesti. Sulfolyser[®] säilyy +1 - +30 °C -lämpötilassa pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti tai avattuna kaksi kuukautta (Automated Hematology Analyzer XE-2100.)

Cellclean[®] on vahva emäksinen pesuliuos jonka avulla poistetaan lysoivat reagenssit, solujäämät ja veri analysaattorin sisäosista. Cellclean[®] -pesuliuosta säilytetään +15 - +30 °C -lämpötilassa. E-Check[®] (XE) on kontrolliveri jota käytetään Sysmex[®] XE-5000 -analysaattorin kontrollina. Vaikka kontrolliveri on tutkittu ja siinä ei pitäisi olla vaarallisia taudinaiheuttajia (mm. HIV-1, HIV-2 ja Hepatiitti-B), niin sitä pitäisi käsitellä sopivin varotoimenpitein. Kontrollia säilytetään lämpötilassa +2 - +8 °C. Se säilyy avattuna 14 päivää ja avaamattomana pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti. (Sysmex Europe GMBH 2008, 4-7.) E-Check[®] (XE) -kontrollia on saatavilla eri tasoissa. Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian toimintayksikössä käytetään E-Check[®] (XE) level 2 -kontrollia.

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA ONGELMAT

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, miten EDTA-verinäytteet säilyvät, kun niitä säilytetään huoneenlämmössä 8 tuntia ja 24 tuntia. Näitä tuloksia verrataan ensimmäisiin mittauksiin. Opinnäytetyössä on myös +4 °C jääkaappisäilytyksessä oleva vertailuryhmä, jolle suoritetaan mittaukset samoin aikavälein. Jokaiselle vertailuryhmän näytteelle on myös samasta potilaasta otettu vastinputki huoneenlämpösäilytyksessä. Tutkimusongelmina on selvittää EDTA-verinäytteen säilyvyys verisolujen ja niiden parametrien osalta kahdeksan tunnin jääkaappi- ja huoneenlämpösäilytyksen jälkeen, sekä 24 tunnin jääkaappi- ja huoneenlämpösäilytyksen jälkeen.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa informaatiota siitä, ovatko täydellisten verenkuvanäytteiden tulokset luotettavia pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Seinäjoen keskussairaala hyödyntää tätä informaatiota suunnitellessaan maakunnista tulevien näytteiden kuljetusolosuhteita. Tutkimuksessa ovat mukana kaikki täydellisen verenkuvan parametrit retikulosyyttien määrää, prosentuaalista osuutta sekä leukosyyttien prosentuaalista osuutta lukuunottamatta. Leukosyyttien erittelylaskennan säilyvyys selviää myös absoluuttisista arvoista jotka on otettu mukaan tutkimukseen. Retikulosyytit rajattiin pois, jotta tutkimuksesta ei tule liian laaja.

6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Empiirinen tutkimus perustuu tiettyihin teoreettisen tutkimuksen perusteella kehitettyihin menetelmiin. Tutkimusongelmana voi olla esimerkiksi teoriasta johdetun hypoteesin toteutumisen tutkiminen käytännössä tai jonkin tietyn ilmiön syiden selvittäminen. Kaikille empiirisille tutkimuksille on yhteistä se, että niiden tavoitteena on vastausten saaminen tutkimusongelmiin. (Anttila 2005, 391; Heikkilä 2008, 13.)

Opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen. Kvantitatiivinen tutkimus on yksi empiiriseen tietoteoriaan pohjautuvista tutkimusmenetelmistä (Anttila 2005, 236). Kyseisen tutkimusmenetelmän avulla voidaan selvittää lukumääriin ja prosenttiosuuksiin liittyviä kysymyksiä. Kvantitatiivinen tutkimus tulkitsee ja kuvaa ilmiöitä tieteen ja yleisen logiikan mukaisesti. Tutkimuksesta saatuja tuloksia kuvataan numeerisessa muodossa ja havainnollistamiseen käytetään erilaisia kuvioita ja kaavioita. Oleellista kvantitatiivista tutkimusmenetelmää käytettäessä on, että tutkimusaineisto soveltuisi numeeriseen ja määrälliseen mittaukseen. (Heikkilä 2008, 16; Hirsjärvi ym. 2009, 140.)

Opinnäytetyö on myös kokeellinen ja vertaileva. Kokeellinen eli eksperimentaalinen tutkimus on yksi selittävän tutkimuksen erityismuoto. Sekä selittävä että kokeellinen tutkimus ovat kvantitatiivisen tutkimuksen eri muotoja. Kokeellista tutkimusta käytetään tutkittaessa tietyn koemuuttujan tai koemuuttujien vaikutusta kontrolloidussa olosuhteessa ja sitä kuvaa systemaattinen sekä kontrolloitu havaintojen kerääminen. Tavallisesti kokeellisessa tutkimuksessa käytetään myös niin sanottua vertailuryhmää, josta koemuuttujan tai koemuuttujien vaikutus puuttuu. Otoksesta eli koeryhmästä saatuja tuloksia verrataan vertailuryhmästä saatuihin tuloksiin. (Anttila 2005, 183–184, 270; Heikkilä 2008, 21). Opinnäytetyössä tutkitaan huoneenlämpösäilytyksen pituuden vaikutusta täydellisen veren kuvan näytteisiin. Vertailuryhmän näytteitä säilytettiin jääkaapissa, jolloin huoneenlämpösäilytyksen vaikutus niihin eliminoitiin kokonaan.

Kokeellisessa tutkimuksessa valitaan perusjoukko eli populaatio, joka on tutkimuksen kohde. Usein perusjoukko on niin suuri tai vaikeasti saavutettavissa, että siitä valitaan otannan avulla vain tietyn suuruinen otos joka otetaan mukaan tutkimukseen. (Anttila 2005, 239; Heikkilä 2008, 16; Laininen 2004, 7). Otoksen koko on aina määriteltävä tutkimuskohtaisesti eikä se riipu ainoastaan yksittäisestä tekijästä. Otoksen kokoon vaikuttavat esimerkiksi tutkimuksen tarkkuusvaatimukset, mitattava ominaisuus ja oletettujen tekijöiden lukumäärä, jotka vaikuttavat mitattavaan ominaisuuteen. Tekijöitä tai asioita, jotka muodostavat otoksen, kutsutaan havaintoyksiköiksi. (Vilkkä 2007, 52.) Perusjoukkona ovat sairaalasta otetut EDTA-veriputket, joista tehdään täydellinen verenkuva. Näistä EDTA-veriputkista pyritään valitsemaan 70:n kappaleen otos, jota säilytetään huoneenlämmössä. Koeryhmän lisäksi pyritään valitsemaan vähintään 30 kappaleen suuruinen vertailuryhmä, jota säilytetään +4 °C jääkaapissa. Jokaiselle vertailuryhmän EDTA-veriputkelle on myös samasta potilaasta otettu vastinputki, jota säilytetään koeryhmän tavoin huoneenlämmössä. Kaikki 100 huoneenlämmössä säilytettävää näytettä muodostavat tutkimuksen koeryhmän.

Otoksen valintaan on olemassa monta eri otantamenetelmää ja edustavan otoksen saamiseksi oikean otantamenetelmän valinta on erittäin tärkeää. Menetelmän valintaan vaikuttavat monet eri tekijät, kuten esimerkiksi perusjoukon koko, tutkimuksen tavoitteet ja tutkimukseen käytettävät resurssit. (Heikkilä 2008, 35). Opinnäytetyössä sekä otoksen että vertailuryhmän valintaan käytetään harkinnanvaraista otantaa.

Harkinnanvaraista otantaa käytettäessä tutkimuskohteet valitaan tutkijan harkinnan mukaan hänen perustellusti parhaaksi näkemällään tavalla (Vilkkä 2007, 58). Opinnäytetyössä päädyttiin sekä otoksen että vertailuryhmän valinnassa käyttämään harkinnanvaraista otantaa. Koeryhmän näytteet valitaan sattumanvaraisesti jo analysoiduista näytteistä. Otoksen pitää olla kattava ja tämä varmistetaan ottamalla osa vertailuryhmän EDTA-veriputkista hematologian vuodeosastolta. Vertailuryhmän näytteillä on vastinputki huoneenlämmössä, jotka muodostavat osan koeryhmästä. Näin saadaan mukaan kattavasti normaaleja ja patologisia näytteitä sekä huoneenlämpö- että jääkaappisäilytykseen.

Otoksen edustavuuden arvioinnissa pitää huomioida, että siitä tehtävät päätelmät soveltuvat vain otosta koskevaan perusjoukkoon. Tuloksia ei siis voida välttämättä yleistää. Otoksen edustavuutta parantaa sen suuruus. Niinpä otoksen suuruutta päätettäessä tulee ottaa huomioon, että mitä suurempi otos on, sitä suuremmalla varmuudella sen keskiarvo on lähempänä perusjoukon keskiarvoa (Anttila 2005, 240; Heikkilä 2008, 16).

Jokaisen havaintoyksikön kaikki tiedot tallennetaan taulukkoon. Tätä taulukkoa, johon muuttujia koskevat havainnot on syötetty, kutsutaan havaintomatriisiksi. Havaintomatriisissa vaakarivillä ovat tavallisesti kaikkien muuttujien tiedot ja pystysarakkeessa yhtä asiaa koskevat tiedot jokaiselta havaintoyksiköltä. Pystysarakkeessa olevat tiedot vaihtelevat kaikilla havaintoyksiköillä. Näitä pystysarakkeessa olevia tietoja kutsutaan muuttujan havainnoiksi. (Vilkka 2007, 111.)

Aineiston keräämisen, tallentamisen ja tarkistamisen jälkeen alkaa aineiston käsittely (Heikkilä 2008, 143). Havaintomatriisiin syötetyt tiedot tulee käsitellä niin, että tutkimusongelma saadaan ratkaistua. Analyysitapa riippuu siitä, tutkitaanko vain yhtä muuttujaa vai kahden tai useamman muuttujan välistä riippuvuutta ja vaikutusta toisiinsa. Jos halutaan tietää miten havaintoarvot poikkeavat toisistaan, voidaan käyttää esimerkiksi hajontalukuja. (Vilkka 2007, 119.) Syötetyt tiedot esitetään tekstillä, taulukolla ja kuviolla. Hyvälle tilastokuvioille on ominaista, että se välittää tiedon visuaalisesti, se välittää suuren määrän tietoa pienessä tilassa ja se muodostaa kiinteän kokonaisuuden muun aineiston kuvauksen kanssa. Tilastokuvioilla voidaan osoittaa aineiston säännönmukaisuutta ja sillä voidaan osoittaa, kuinka asiat ovat keskenään kytkeytyneet. (Heikkilä 2008, 154-155.)

Opinnäytetyössäkin käytettävässä boxplot -kuviossa esitetään mediaani, ylä- ja alakvartiili sekä kvartiilivälin pituus. Näillä pystytään kuvaamaan aineiston muotoa (Vilkka 2007, 122). Väli, jossa esiintyvät keskimmäiset 50 % havainnoista, kutsutaan kvartiiliväliksi. (Tilastokeskus 2012.) Tämä 50 % alue muodostaa ”laatikon” (box). Laatikon pohja on alakvartiili ja kansi yläkvartiili. (Heikkilä 2008, 175.) Alakvartiilia pienempiä arvoja aineistossa on 25 % ja yläkvartiilia suurempia arvoja on 25 %. (Tilastokeskus 2012) Minimi ja maksimi ovat kvartiilien muodostamasta laatikosta lähtevien viivojen (viiksien) päissä. Laatikon keskellä oleva neliö kuvaa mediaania. Kvartiilien avulla aineisto voidaan jakaa osiin ja näin vertailla keskenään. Pystyjanat (whiskers eli ”viikset”) kuvaavat tulosten vaihteluväliä. (Heikkilä 2008, 175; Vilkka 2007, 122.)

Kokeellisen tutkimuksen tuloksia arvioidaan reliabiliteetin ja validiteetin avulla. Reliabiliteetti kuvaa luotettavuutta. Tämä tarkoittaa mittaustulosten toistettavuutta eli tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Reliabiliteettia tulee arvioida jo tutkimuksen aikana ja myös tutkimuksen jälkeen. Reliabiliteettia arvioitaessa tarkastellaan ennen kaikkea mittaukseen liittyviä asioita ja tutkimuksen toteutuksen tarkkuutta. Validiteetti ilmaisee sitä, missä määrin tutkimuksessa on onnistuttu mittaamaan juuri sitä mitä pitikin mitata. Validiteettia voidaan pitää hyvänä, jos tutkija ei ole joutunut käsitteiden tasolla harhaan ja tutkimuksessa ei ole systemaattisia virheitä. (Vilkkä 2007, 149-152.) Validiutta on hankala käsitellä jälkikäteen, joten se on varmistettava etukäteen tutkimuksen huolellisella suunnittelulla ja tarkalla tiedonkeruulla. Myös perusjoukon tarkka määrittely ja edustava otos auttavat validin tutkimuksen toteuttamisessa. (Heikkilä 2008, 30.) Opinnäytetyön validiteetti varmistetaan määrittämällä perusjoukko tarkasti, ottamalla siitä kattava otos ja perehtymällä aihetta käsittelevään teorian tietoon ennen kokeellisen osuuden suoritusta. Teoriatiedon pohjalta valitaan sopivin tutkimusmenetelmä. Tulosten luotettavuutta parantaa myös E-check[®] ja 820 –kontrollien käyttö.

7 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

Opinnäytetyön aihe saatiin alkusyksystä 2011 Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian toimintayksikön ylikemisti Kari Åkermanilta. Opinnäytetyösuunnitelman tekeminen aloitettiin alkusyksystä 2011 ja se valmistui marraskuussa 2011. Lupa opinnäytetyön toteuttamiseen saatiin joulukuussa 2011 kliinisen kemian toimintayksikön ylilääkäri Onni Niemelältä ja ylikemisti Kari Åkermanilta. Kari Åkermanin kanssa keskusteltiin tarkemmin opinnäytetyön sisällöstä ja sovittiin vuoden 2012 huhtikuun puoliväli opinnäytetyön kokeellisen osuuden suorittamisen ajankohdaksi.

7.1 Esitutkimus

Esitutkimus suoritettiin 15. - 16.3.2012 välisenä aikana Tampereen ammattikorkeakoulussa Sysmex® XS-1000i -analysaattorilla. Esitutkimuksessa käytettävät EDTA-verinäytteet otettiin kahdelta vapaaehtoiselta opiskelijatoverilta. Näytteitä otettiin yhteensä 29 kappaletta, jotka mitattiin tunnin kuluessa näytteenotosta. Näytteitä sekoitettiin ennen mittausta 2 -5 minuuttia koeputkisekoittajassa. Näytteistä 20 kappaletta säilytettiin huoneenlämmössä ja yhdeksää jääkaapissa vuorokauden ajan. Vuorokauden säilytyksen jälkeen näytteet olivat 2-5 minuuttia koeputkisekoittajassa jonka jälkeen ne mitattiin. Jääkaapissa säilytetyt yhdeksän EDTA-verinäytettä toimivat esitutkimuksessa vertailuryhmänä huoneenlämpösäilytyksessä olleille näytteille.

Käytettävät EDTA-veriputket olivat muovisia BD Vacutainer® K2-EDTA -veriputkia joiden tilavuus oli 3ml ja EDTA-konsentraatio 5.2mg. Näissä putkissa EDTA on kuivamuotoisena putken sisäpinnassa. Esitutkimuksen avulla saatiin alustavaa tietoa huoneenlämpösäilytyksen vaikutuksesta täydellisen verenkuvan parametrien tuloksiin. Vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen täydellisen verenkuvan parametreista MCV:n ja RDW-SD:n sekä CV:n tulokset nousivat nollamittauksiin verrattuna, kun taas HCT:n ja MCHC:n tulokset laskivat. Muiden parametrien tuloksissa ei havaittu huomattavia muutoksia. Myös jääkaapissa säilytetyissä näytteissä ei havaittu muutoksia nollamittauksiin verrattuna. Esitutkimuksen perusteella varsinaisen tutkimuksen suorittamissuunnitelma pystyttiin suunnittelemaan paremmin. Saatuja tuloksia ei säilytetty, eikä niitä sisällytetty opinnäytetyöhön.

7.2 Tutkimusaineiston hankinta ja valinta

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin kliinisen kemian toimintayksikön kemisti Johanna Kultti toimi yhteyshenkilönä tutkimuksen käytännön järjestelyissä. Tutkimus päätettiin toteuttaa 23. - 25.4.2012 välisenä aikana. Kliinisen kemian toimintayksikön laboratoriohoitajat ottivat vertailuryhmään kuuluvat EDTA-verinäytteet vuodeosastoilta heille viikkoraportilla annettujen ohjeiden mukaisesti (liite 2). Vertailuryhmää varten jokaisesta potilaasta otettiin kaksi EDTA-veriputkea. Toinen näistä putkista säilytettiin +4 °C jääkaapissa ja toinen huoneenlämmössä. Näin saatiin jääkaapissa säilytettävälle putkelle huoneenlämmössä säilytettävä vastinputki samasta potilaasta. Loput tutkimusnäytteet valittiin satunnaisesti potilasnäytteiden joukosta. Näytteet otettiin K2-EDTA:ta sisältäviin BD Vacutainer® -veriputkiin joiden tilavuus oli 3ml ja EDTA-pitoisuus 5.4mg (kuva 15). Näissä putkissa EDTA oli kuivamuodossa putken sisäpinnassa.



KUVA 15. BD Vacutainer® 3ml K2-EDTA -veriputki. (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Vertailuryhmän näytteet otettiin pääasiassa hematologian vuodeosastolta. Näin varmistettiin myös patologisten näytteiden esiintyvyys otoksessa. Sysmex® XE-5000 -analysaattori antoi liputuksen 37 koeryhmän näytteelle ja 17 vertailuryhmän näytteelle. Tutkimukseen otettiin mukaan vain aikuisten verinäytteitä. Näytteet otettiin potilaista, joista otettiin muutenkin joko täydellinen- tai perusverenkuvaanäyte. Vertailuryhmän näytteitä saatiin tutkimusta varten tavoiteltua enemmän, 37 kappaletta sekä jääkaappi-

että huoneenlämpösäilytykseen. Tavoitteena oli saada tutkimukseen vertailuryhmä mukaan luettuna n. 100 näytettä. Huoneenlämmössä säilytettäviä tutkimusnäytteitä valittiin satunnaisesti 70 kappaletta potilasnäytteiden joukosta. Yhteensä tutkimukseen saatiin 144 EDTA-veriputkea.

Kaikki näytteet kerättiin Seinäjoen keskussairaalan vuodeosastoilta. Muiden näytteenotopisteiden näytteitä ei voitu käyttää, sillä niiden saapuminen klinisen kemian toimintayksikköön olisi kestänyt tutkimuksen kannalta liian kauan. Tutkimuksessa otettiin huomioon huoneenlämmön ja ajan vaikutus täydellisen verenkuvan parametreihin, muualta tuoduissa olisi ollut mahdollisesti myös kuljetuksen aiheuttamia muuttujia. Tämän vuoksi otokseen on valittu vain Seinäjoen keskussairaalassa otettuja näytteitä.

7.3 Näytteiden määrittäminen ja tulosten kirjaaminen

Näytteiden tunnistamisessa päätettiin käyttää viivakooditarroja, joissa oli juokseva numerointi. Huoneenlämmössä säilytetyille tutkimusnäytteille käytettiin numerointia 000001-000070. Vertailuryhmän näytteille tehtiin kahdet eri numerosarjat, 00001H-00037H huoneenlämmössä säilytetyille näytteille ja 00001J-00037J jääkaapissa säilytetyille näytteille. Viivakoodien käyttämiseen päädyttiin, koska tutkimuksessa käytettävä Sysmex[®] XE-5000 -analysaattori tunnistaa putkista suoraan viivakoodit. Tällä tavoin näytteille saatiin määrittämisessä yhteydessä tunniste, jolla tulokset tallentuivat tietokantaan. Erillisten viivakoodien ansiosta potilaiden nimiä ei tarvinnut käyttää missään vaiheessa tutkimusta. Näin varmistettiin potilaiden yksityisyydensuojan säilyminen. Tutkimuksessa käytettävät mittausajankohdat olivat 0 tuntia, 8 tuntia ja 24 tuntia näytteenotosta. Tavoitteena oli, että ensimmäinen mittaus suoritettaisiin enintään yhden tunnin kuluttua näytteenotosta.

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian laboratoriossa on kaksi Sysmex[®] XE-5000 -analysaattoria joista pelkästään toista käytettiin tutkimuksessa. Näin poistettiin mahdolliset analysaattoreiden väliset erot. EDTA-veriputkia pidettiin koeputkisekoittajassa (kuva 16) noin 2-5 minuutin ajan ennen jokaista mittausta. Jääkaapissa säilytettyjen näytteiden annettiin lämmetä huoneenlämpöiseksi ennen niiden mittaamista. Tutkimuksessa käytetyssä jääkaapissa oli lämpötilaseuranta, josta ilmeni, että jääkaapin lämpötila ei laskenut eikä noussut sallittujen rajojen ulkopuolelle. Rajana oli +2 - +6 °C lämpötila.

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian toimintayksikössä Sysmex[®] XE-5000 –analysaattorin kontrolleina olivat Sysmex[®] yhtiön oma E-Check[®]-kontrolli ja potilasnäytteistä valittu 820 –kontrolli. E-Check[®] määritettiin joka aamu klo 7-8 välillä. Potilasnäytteistä valittu 820 –kontrolli määritettiin aamulla, iltapäivällä ja illalla. Jokaisen kontrollin tulos oli asetetuissa rajoissa.



KUVA 16. Koeputkisekoittaja. (Kuva: Werner Hyvärinen & Jesse Lehtola 2012)

Ensimmäisenä päivänä 23.4.2012 saatiin 57 näytettä, joista 10 kuului vertailuryhmään. Ensimmäiset mittaukset saatiin suoritettua klo 9.40 mennessä. Tämän jälkeen näytteet mitattiin uudelleen noin kahdeksan ja 24 tunnin kuluttua. Toisena päivänä 24.4.2012 saatiin 50 uutta näytettä joista 27 kuului vertailuryhmään. Näiden toisen päivän näytteiden ensimmäiset mittaukset saatiin suoritettua klo. 10 mennessä. Seuraavat mittaukset suoritettiin kahdeksan ja 24 tunnin kuluttua. Näytteiden suuri määrä ja pelkästään yhden analysaattorin käyttäminen johti siihen, että toisen päivän näytteiden ensimmäinen mitaus viivästyi tavoitteesta. Tavoiteltu mittausajankohta eli enintään yksi tunti näytteenotosta venyi noin kahteen tuntiin näytteenotosta. Kahdeksan tunnin mitaus piti suunnitella siten, ettei se ole samaan aikaan maakunnasta tulevien näytteiden määrittämisen kanssa. Alkuperäisen nollamittauksen ajankohta ei olisi ollut sopiva, sillä sen perusteella kahdeksan tunnin mitaus olisi ollut samaan aikaan maakunnan näytteiden määrittämisen kanssa.

Aina kun yksi mittaussarja saatiin suoritettua, tulokset tallennettiin muistitikulle. Tallennus onnistui Sysmex[®] XE-5000 -analysaattorin oman ohjelman kautta. Kyseinen ohjelma tallensi jokaisen valitun tuloksen yhteen comma-separated values eli .csv -tiedostomuotoon. Näitä tiedostoja järjesteltiin Microsoft[®] Office Excel 2007 -ohjelmassa havaintomatriisiksi (liite 4). Saatua havaintomatriisi siirrettiin Tixel[®]-tilasto-ohjelmaan, jonka avulla tulokset analysoitiin ja siirrettiin esitettävään muotoon. Tulosten analysoinnissa käytettiin boxplot- eli laatikkoviikset -kuvioita.

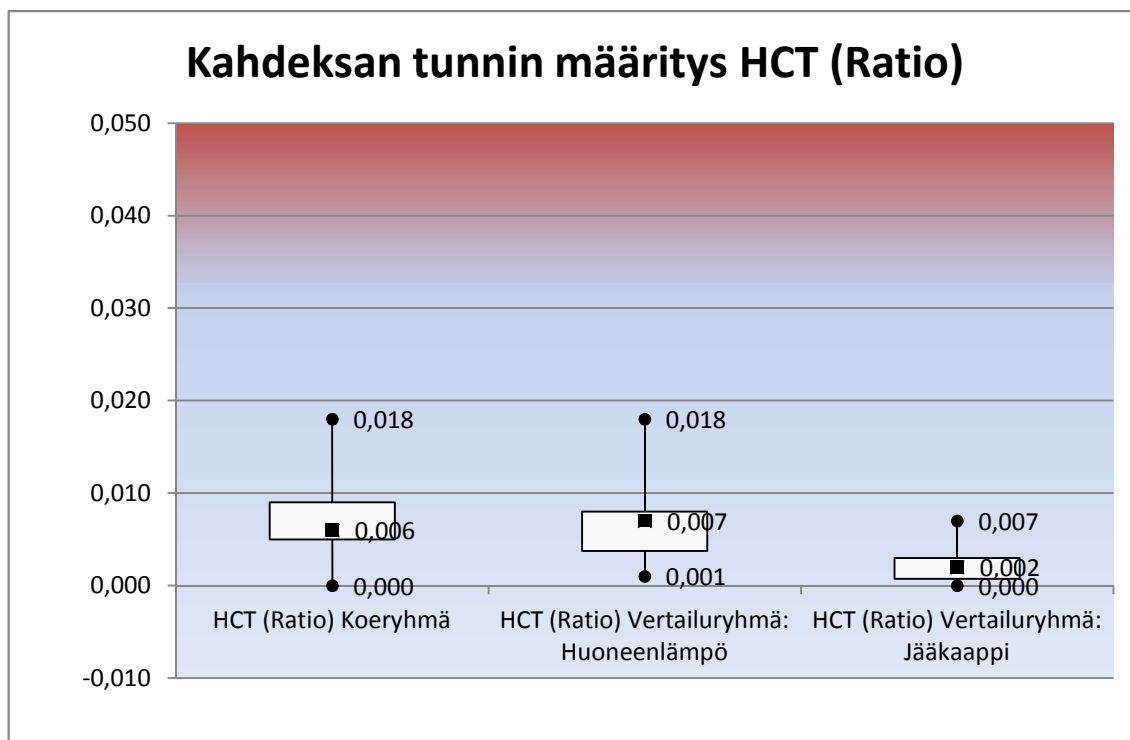
8 TUTKIMUSTULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimusaineisto koostui 142 näytteestä, jotka kaikki määritettiin Sysmex® XE-5000 – analysaattorilla. Huoneenlämmössä säilytettiin 106 näytettä, näistä 36 näytteelle oli samasta potilaasta otettu vastinputki +4 °C jääkaappisäilytyksessä. Jääkaapissa säilytetyt näytteet toimivat vertailuryhmänä tutkimuksessa. Kaikki näytteet määritettiin kolme kertaa: mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen, kahdeksan tunnin päästä ensimmäisestä määrityksestä ja 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrityksestä.

Kahdeksan ja 24 tunnin määityksessä saatuja tuloksia verrattiin nollanäytteen tuloksiin. Kahdeksan tunnin tuloksien poikkeama nollanäytteen tuloksien suhteen selvitettiin vähentämällä kahdeksan tunnin tuloksista nollanäytteen tulokset. Saadusta erotuksesta otettiin itseisarvo, jottei numeerinen arvo olisi negatiivinen. Samalla tavalla toimittiin 24 tunnin mittaistuloksien poikkeaman selvittämisessä.

Tuloksissa osiossa käsitellään vain osaa parametreista. Tulokset -osiossa on valittu mukaan parametrit, jotka ovat selvästi lähteneet muuttumaan. Näitä parametreja ovat: hematokriitti (HCT), erytrosyyttien keskitilavuus (MCV), hemoglobiinin keskimassakonsentraatio (MCHC), erytrosyyttien kokojakaumaprosentti (RDW-SD) ja erytrosyyttien kokojakauma (RDW-CV). Tulokset -osiossa esitellään myös leukosyyttien (WBC), erytrosyyttien (RBC) ja trombosyyttien (PLT) kokonaismäärän määitykset sekä hemoglobiinin (HGB) määitykset. Nämä parametrit valittiin mukaan, sillä ne ovat keskeisiä tuloksia täydellisessä verenkuvassa. Kaikkia parametreja ei käsitelty erikseen, sillä ne pysyvät lähes muuttumattomina.

8.1 Kahdeksan tunnin määrittäminen

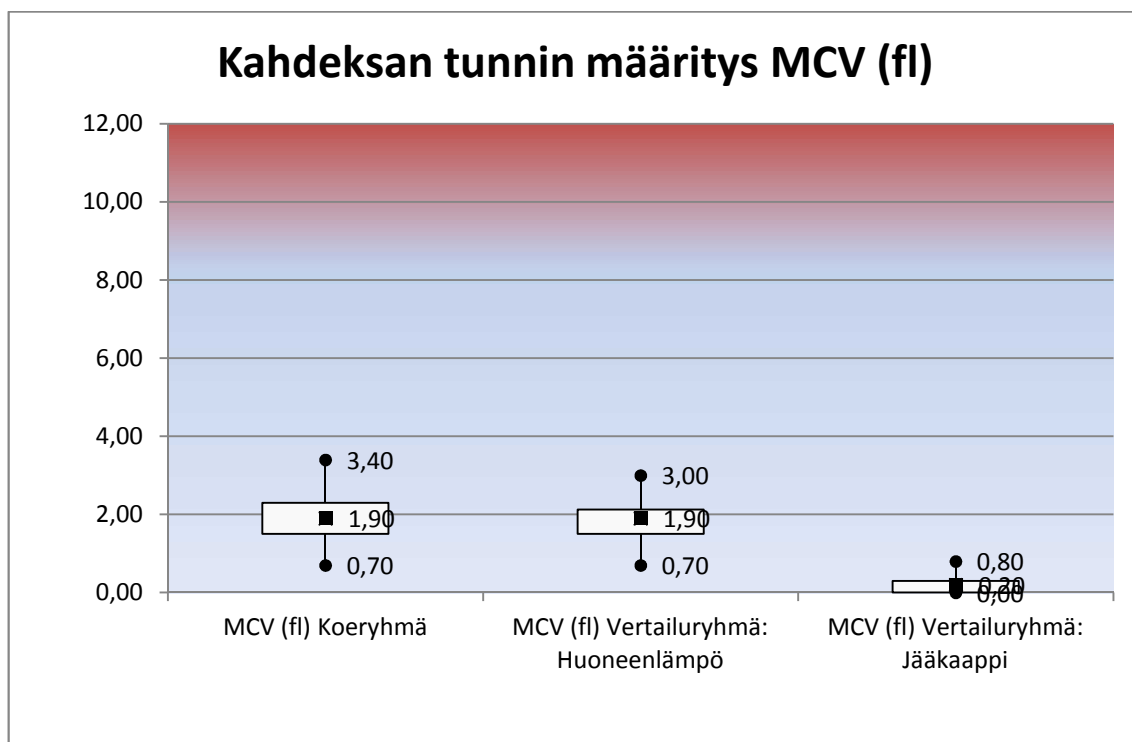


KUVIO 1. HCT:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittämisestä.

Kuvio 1:ssä ensimmäinen boxplot -kuvaaja vasemmalta katsottuna kuvaa kaikkien koeryhmän, eli 106 huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden muutosta verrattuna ensimmäiseen määrittäykseen. Tähän kuuluu myös vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien muutos. Keskimmäinen boxplot -kuvaaja on vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien muutos ensimmäisestä määrittäyksestä. Viimeinen boxplot -kuvaaja kuvaa +4 °C jääkaapissa säilytettyjen näytteiden muutosta. Tällaiseen esitystapaan päädyttiin, koska vertailuryhmän näytteiden ja niiden huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien muutosta pystytään luotettavasti vertaamaan keskenään. Luotettavuus syntyy siitä, koska vertailuryhmän näyte ja huoneenlämmössä säilytetty näyte ovat otettu samalla hetkellä samasta potilaasta. Kaikkien parametrien osalta kuvaaja on samanlainen.

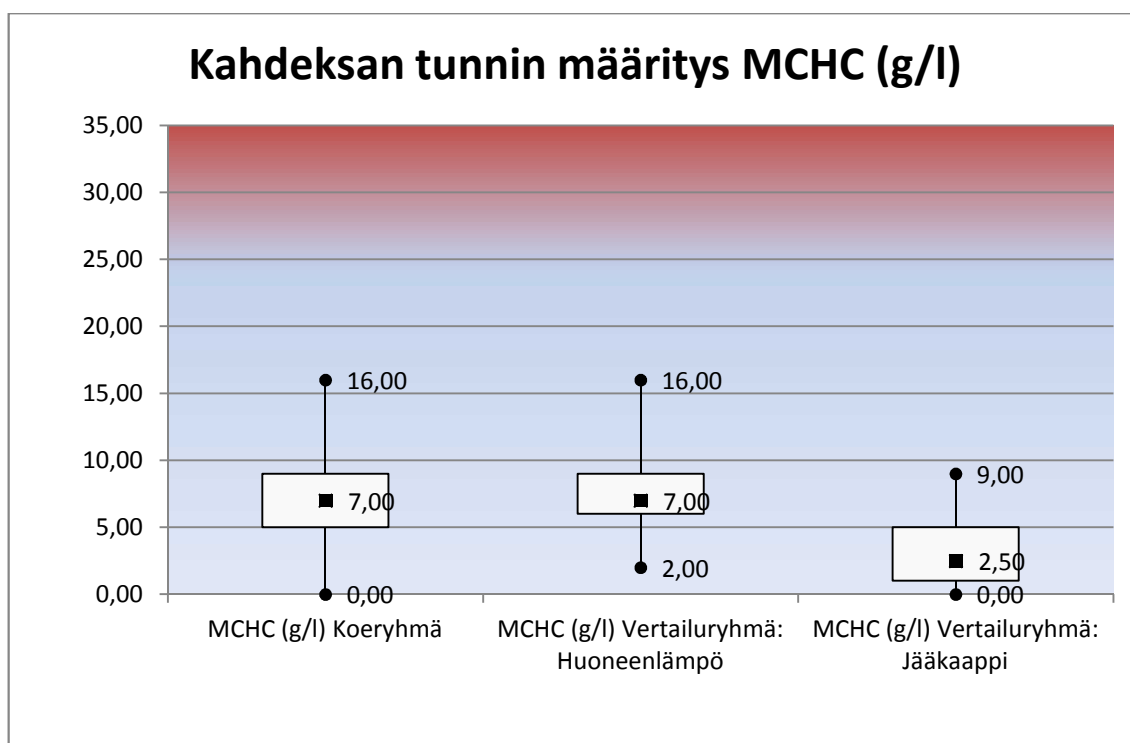
Hematokriitin tulokset suurenevat määrittäysten välillä. Huoneenlämmössä säilytettyjen koeryhmän maksimimuutos oli 0,018, mediaani 0,006 ja minimi nolla (kuvio 1). Jääkaapissa säilytetyn vertailuryhmän näytteiden maksimimuutos oli 0,007, kun taas

vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien maksimimuutos oli 0,018. Myös vertailuryhmän mediaani (0,002) oli pienempi kuin huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien mediaani (0,007). Vertailuryhmän minimi pysyy nollassa, mutta niiden vastinputkien minimi oli 0,001.



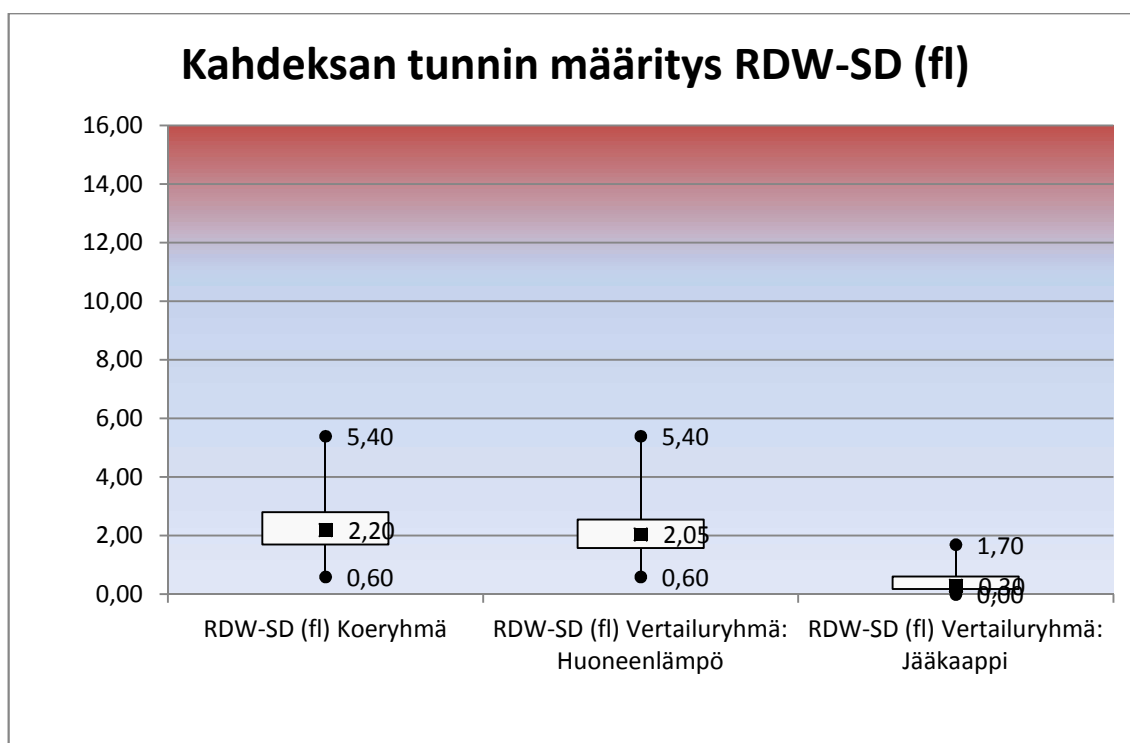
KUVIO 2. MCV:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä.

Erytrosyyttien keskitilavuuden osalta koeryhmän näytteiden tulokset ovat lähteneet kohtaan (kuva 2). Maksimimuutos oli 3,40 femtolittraa (fl) ja minimimuutos 0,70 femtolittraa (fl) verrattuna ensimmäisen mittauksen tuloksiin. Mediaaniksi saatiin 1,90 (fl) Jääkaappisäilytyksessä olleiden näytteiden maksimimuutos on 0,80 femtolittraa, kun taas huoneenlämmössä olleiden vastinputkien maksimimuutos on 3,00 femtolittraa. Vertailuryhmän minimimuutos on nolla, kun taas vastinputkien minimimuutos on 0,70 femtolittraa. Myös mediaani on matalampi vertailuryhmän näytteissä (0,20 fl) kuin niiden huoneenlämpösäilytys vastinputkissa (1,90 fl).



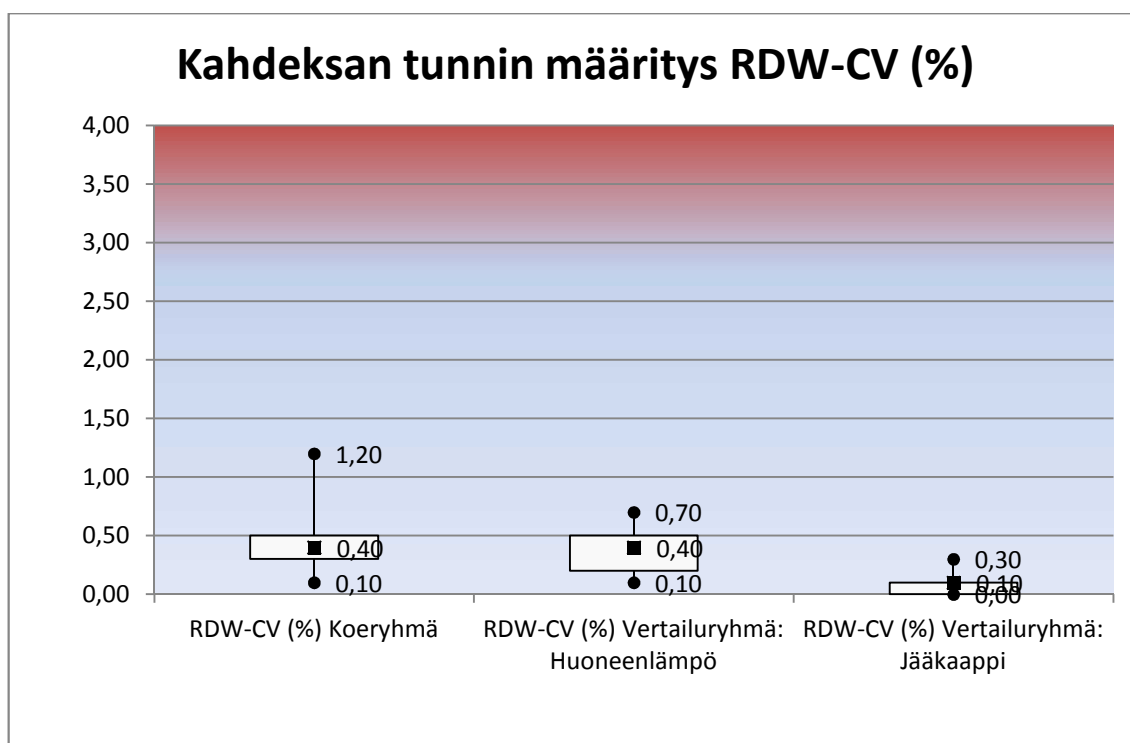
KUVIO 3. MCHC:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittämisestä.

Hemoglobiinin keskimassakonsentraatio lähtee laskemaan huoneenlämmössä koeryhmän näytteissä (kuvio 3). Kahdeksan tunnin jälkeen ensimmäisestä määrittämisestä MCHC on laskenut maksimissaan 16,00 g/l. Huoneenlämpösäilytysryhmässä on kuitenkin näytteitä, joissa MCHC:n laskua ei ole tapahtunut. Mediaaniksi saatiin 7,00. Vertailuryhmän maksimimuutos on 9,00 g/l, ja vastinputkien maksimimuutos 16,00 g/l. Vertailuryhmän mediaani (2,50 g/l) jää pienemmäksi kuin vastinputkien mediaani (7,00 g/l). Vertailuryhmässä on myös näytteitä, joissa ei tapahdu MCHC:n laskua, mutta vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytetyissä vastinputkissa minimimuutos on 2,00 g/l.



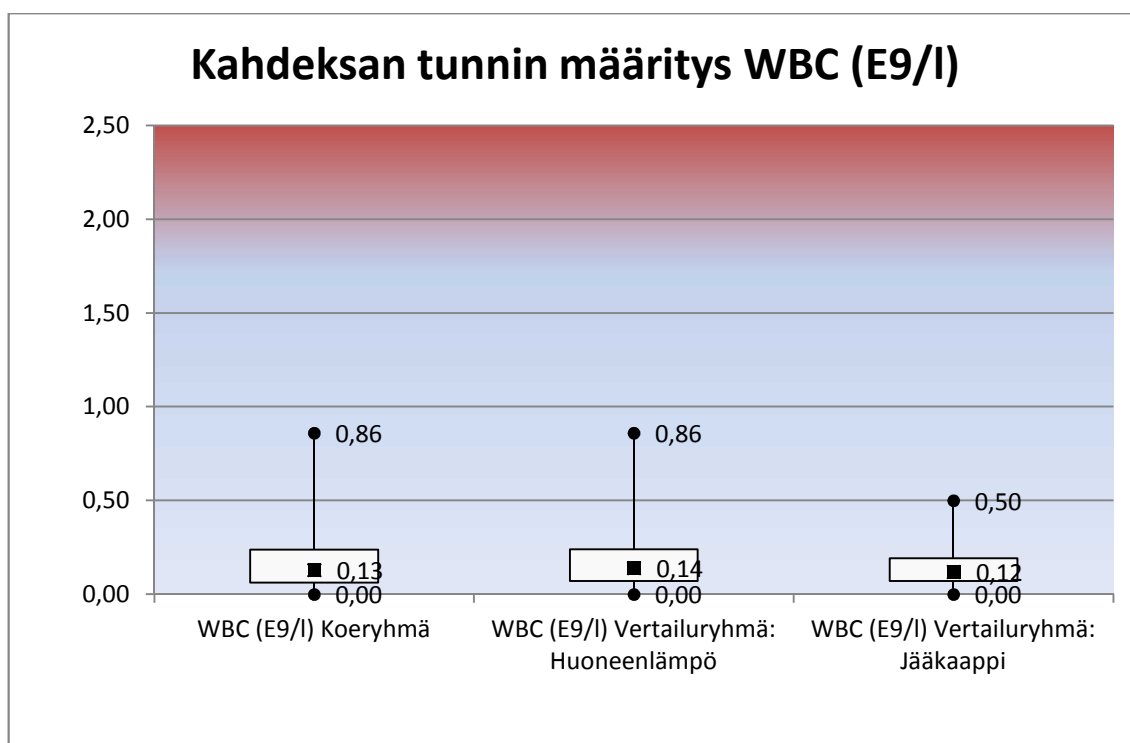
KUVIO 4. RDW-SD:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä.

Erytrosyyttien kokojakaumaprocentti suurenee huoneenlämpösäilytyksessä (kuvio 4). Koeryhmän 106 näytteen minimimuutos oli 0,60 fl, maksimimuutos 5,40 fl ja mediaani 2,20 fl. Vertailuryhmän mediaanimuutos (0,30 fl) on pieni verrattuna huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien mediaaniin verrattuna (2,05 fl). Vaikka vertailuryhmän maksimimuutos on 1,70 fl, on huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien maksimimuutos suurempi 5,40 fl. Osa vertailuryhmän tuloksista ei muutu määrittysten välillä lainkaan, mutta vastinputkien minimimuutos on 0,60 fl.



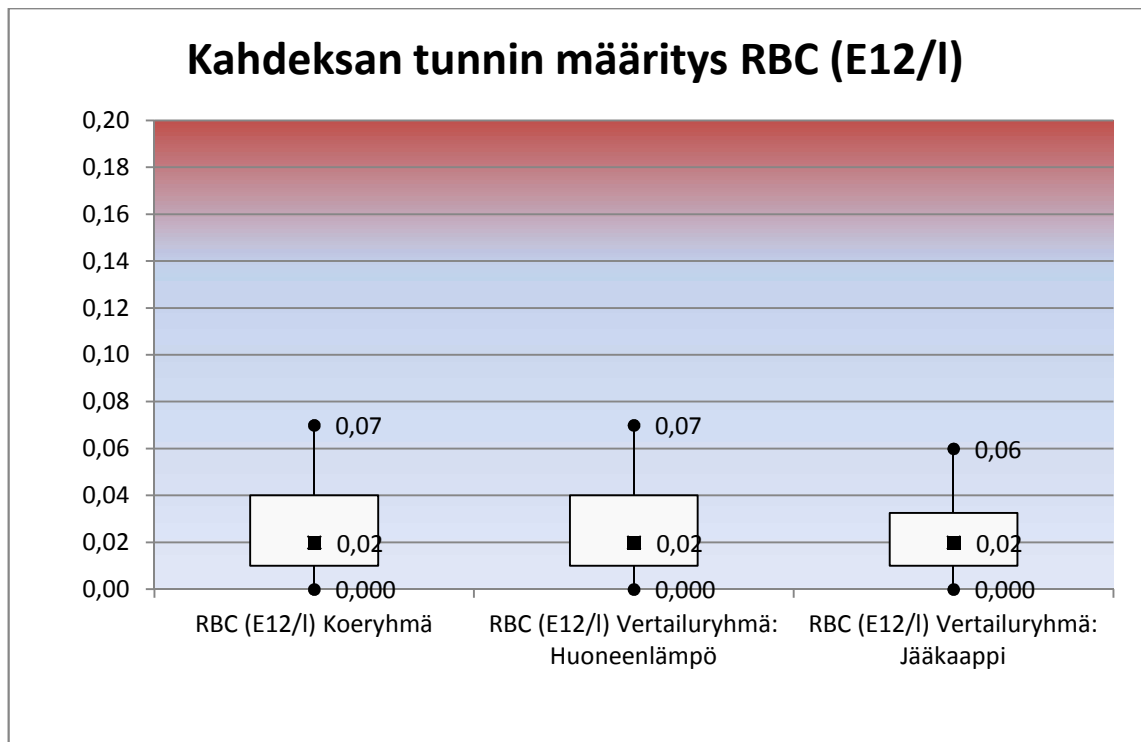
KUVIO 5. RDW-CV:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä.

Toinen erytrosyyttien kokojakaumaa kuvaava suure RDW-CV kohoaa huoneenlämpösäilytyksen seurauksena (kuvio 5). Huoneenlämmössä säilytetyn koeryhmän näytteiden osalta RDW-CV lähti kohoamaan. Minimimuutos oli 0,10 yksikköä, mediaani 0,40 yksikköä ja maksimimuutos 1,20 yksikköä. Vertailuryhmän määritysten välisen muutoksen mediaani oli 0,10 yksikköä, huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien vastaava arvo oli 0,40 yksikköä. Vertailuryhmän maksimimuutos oli 0,30 ja vastinputkien 0,70 yksikköä. Osa vertailuryhmän näytteistä ei muuttunut määritysten välillä lainkaan, jolloin minimimuutokseksi tuli nolla. Vastinputkien tuloksista yksikään ei pysynyt muuttumattomana.



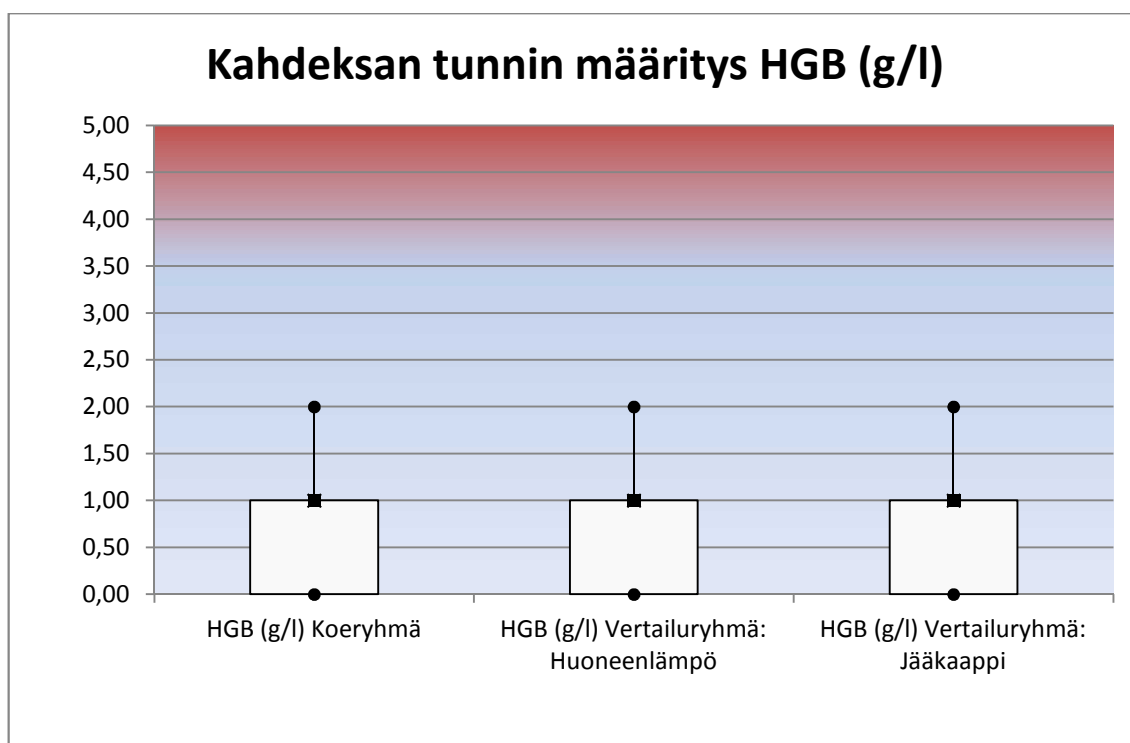
KUVIO 6. WBC:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä.

Huoneenlämmössä säilytetyn koeryhmän näytteiden mittausten välinen maksimimuutos oli leukosyyttien osalta 0,86 E9/l, mediaani 0,13 E9/l ja minimi nolla E9/l (kuvio 6). Muutoksella ei ole tiettyä suuntaa, vaan leukosyyttien määritysten välistä muutosta tapahtuu suurempaan ja pienempää suuntaan. Vertailuryhmässä ja sen vastinputkissa on näytteitä, joiden WBC ei muutu, jolloin minimimuutos on nolla. Vertailuryhmän mediaani on 0,12 E9/l ja niiden vastinputkien 0,14 E9/l. Vertailuryhmän maksimimuutos on 0,50 E9/l ja niiden vastinputkien maksimimuutos 0,86 E9/l.



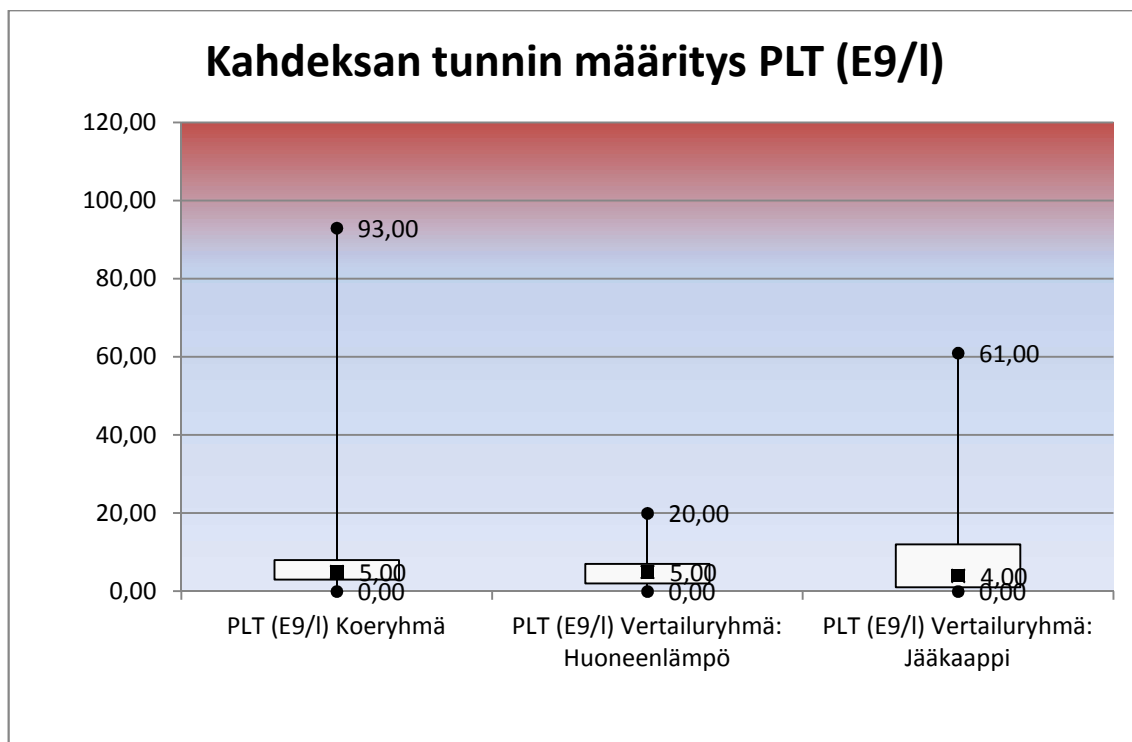
KUVIO 7. RBC:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä.

Huoneenlämmössä säilytetyn koeryhmän osalta erytrosyyttien kokonaismäärän maksimimuutos oli 0,07 E12/l, mediaani 0,02 E12/l ja minimimuutos nolla (kuvio 7). Vertailuryhmän ja sen vastinputkien tulokset ovat, maksimia lukuunottamatta, samankaltaiset, mediaani 0,02 ja minimimuutos nolla. Vertailuryhmän maksimimuutos oli 0,06 E12/l ja sen vastinputkien 0,07 E12/l. Kaikissa ryhmissä mediaani jää pieneksi 0,02 E12/l.



KUVIO 8. HGB:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määityksestä.

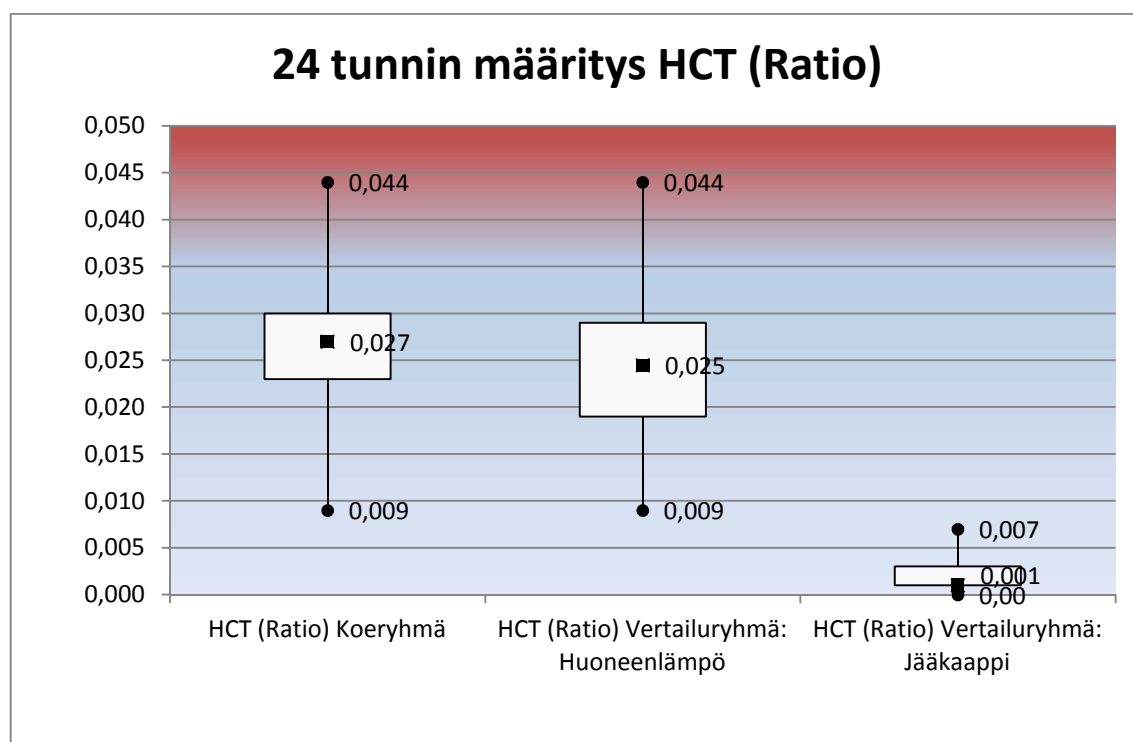
Huoneenlämmössä säilytetyn koeryhmän osalta hemoglobiini on pysynyt stabiilina (kuvio 8). Ensimmäisen määityksen ja kahdeksan tunnin määityksen välinen ero on maksimissaan 2,00 g/l ja minimi nolla. Mediaaniksikin saadaan 1,00 g/l. Vertailuryhmän näytteiden ja niiden huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien välillä ei ole eroa. Molemmilla on sama maksimimuutos (2,00 g/l), minimi (0,00 g/l) ja mediaani (1,00 g/l).



KUVIO 9. PLT:n muutos kahdeksan tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä.

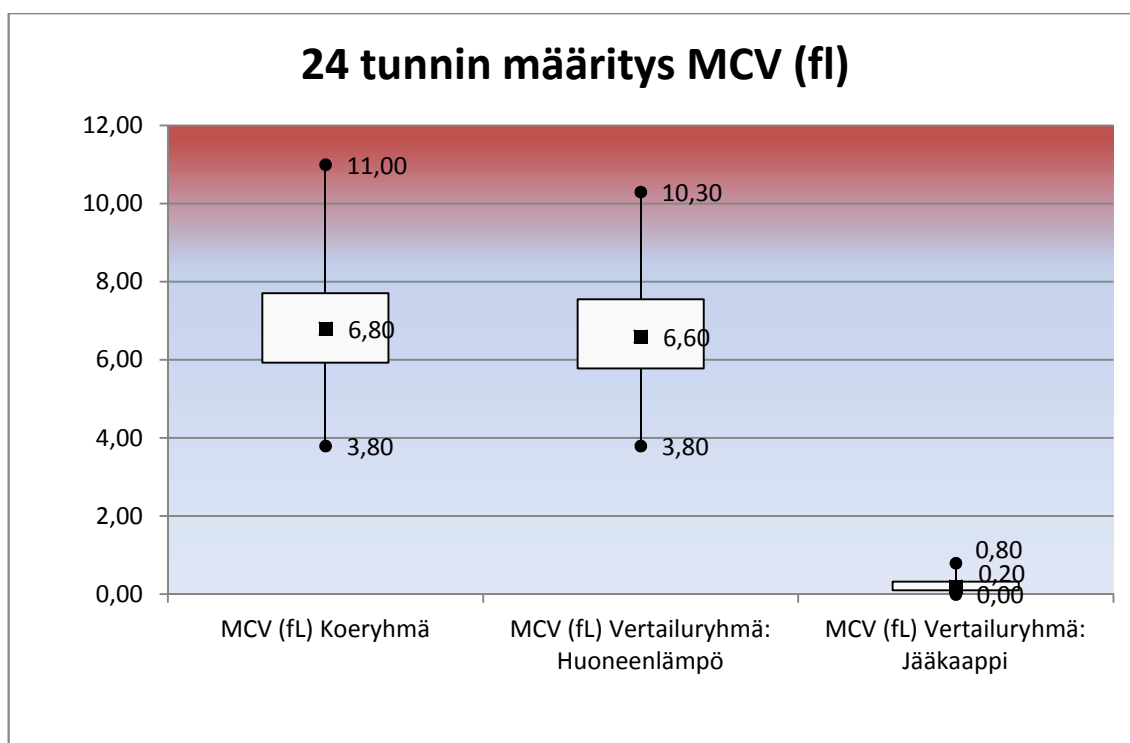
Trombosyyttien määrä sekä vähenee, että suurenee huoneenlämmössä säilytetyssä koeryhmän näytteissä kahdeksan tunnin säilytyksen jälkeen (kuvio 9). Huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden minimimuutos oli nolla. Mediaaniksi saatiin 5,00 E9/l. Maksimuutos oli 93,00 E9/l, joka on yksittäin piikki. Vertailuryhmän PLT -muutokset ovat samankaltaisia niiden huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien muutoksien kanssa. Poikkeuksena on vertailuryhmän maksimi (61,00 E9/l), joka sekin on yksittäin piikkiarvo. Vertailuryhmän mediaani on 4,00 E9/l ja niiden vastinputkien mediaani 5,00 E9/l. Molemmilla minimimuutos on nolla.

8.2 24 tunnin määrittäminen



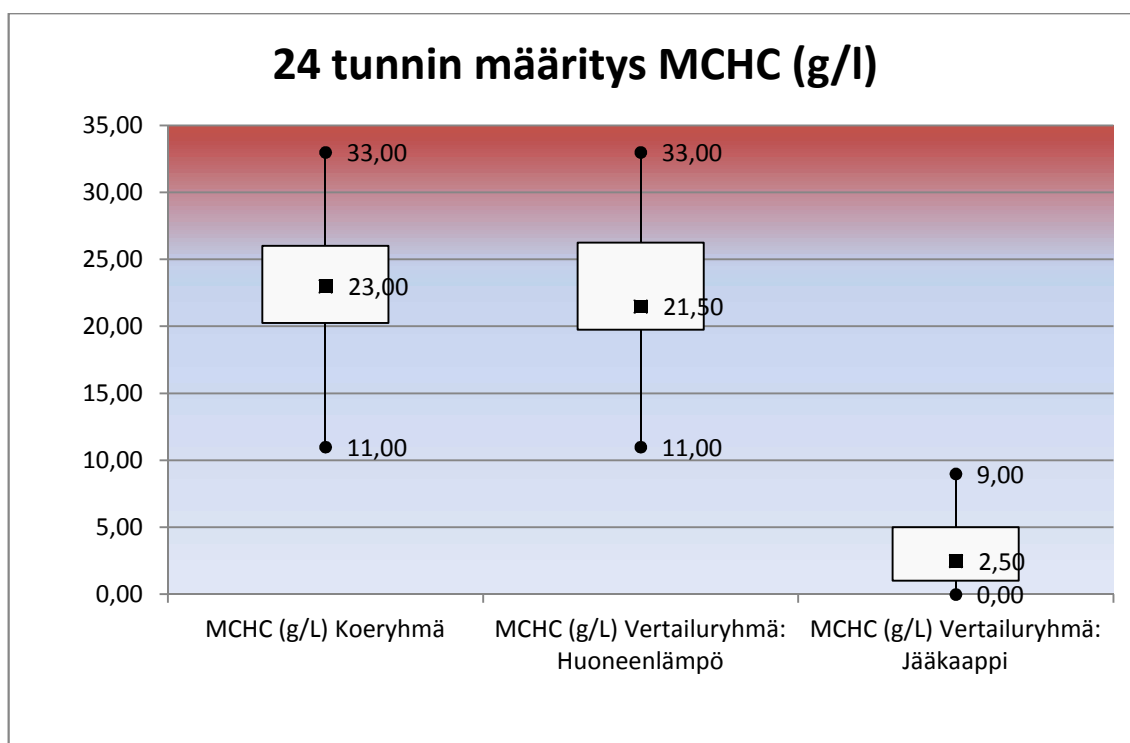
KUVIO 10. HCT:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittämisestä

Hematokriitin tulokset suurenevat määrittäysten välillä. Koeryhmän näytteiden maksimimuutos oli 0,044 ja minimimuutos 0,009. Mediaaniksi saatiin 0,027. Vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien HCT:n tulosten maksimimuutos oli 0,044, minimimuutos 0,009 ja mediaani 0,025 24 tunnin säilytyksen jälkeen (Kuvio 10). Vertailuryhmän näytteiden, joita säilytettiin 24 tunnin ajan +4 °C jääkaapissa, maksimimuutos oli 0,007 ja minimimuutos nolla. Mediaaniksi saatiin 0,001. Vertailuryhmän ja niiden huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien tulosten erot ovat: maksimimuutos oli 0,037, minimimuutos 0,009 ja mediaani 0,024.



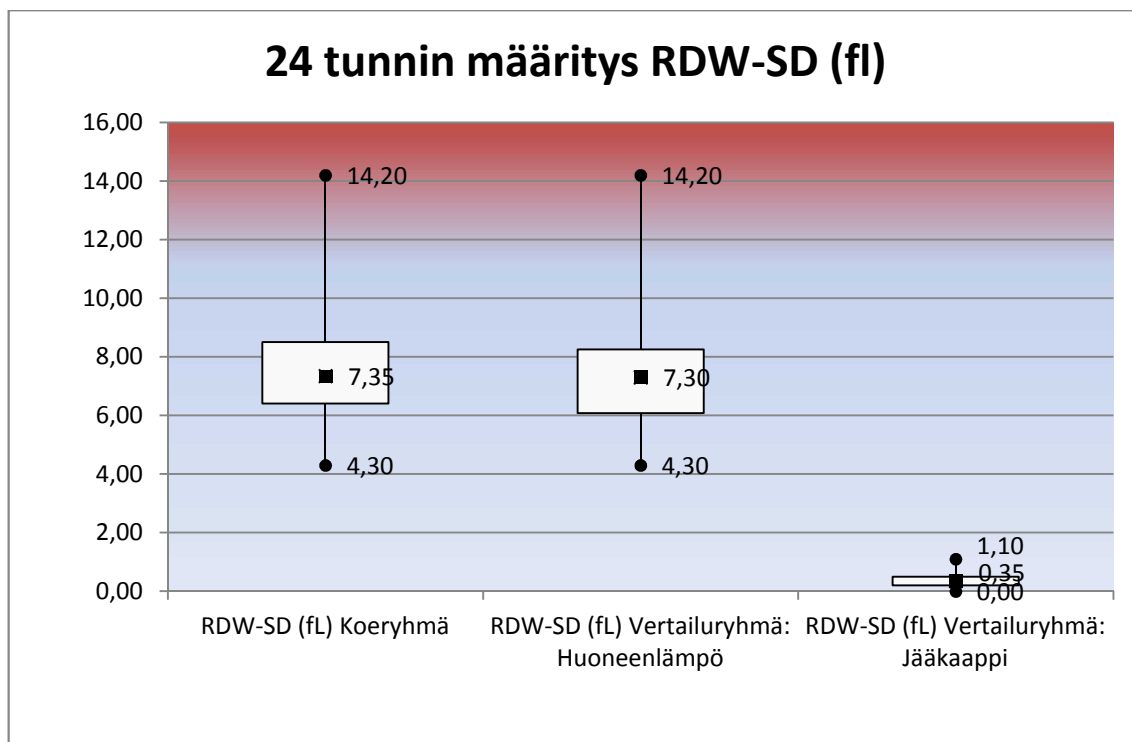
KUVIO 11: MCV:n muutos 24 tunnin huoneenlämpö- ja jääkaappisäilytyksen jälkeen

Erytrosyyttien keskitilavuus muuttuu suurenevasti määritysten välillä. Koeryhmän erytrosyyttien keskitilavuuden muutokset ovat seuraavat: maksimimuutos 11,00 fl, minimimuutos 3,80 fl. Mediaaniksi saatiin 6,80 fl (kuvio 11). Vertailuryhmän huoneenlämpösäilytyksessä olleiden vastinputkien maksimimuutos oli 10,30 fl, minimimuutos 3,80 fl ja mediaani 6,60 fl. Vastaavasti jääkaapissa säilytettyjen vertailuryhmän näytteiden maksimimuutos oli 0,80 fl, minimimuutos nolla ja mediaani 0,20 fl.



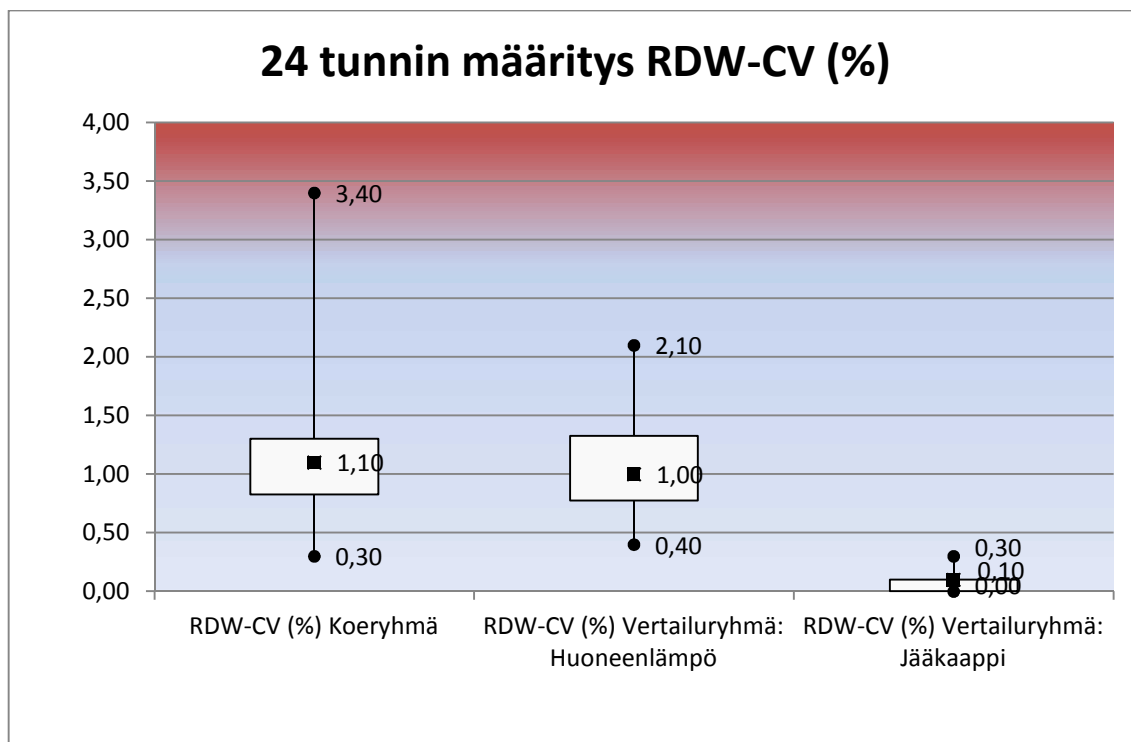
KUVIO 12: MCHC:n muutos 24 tunnin huoneenlämpö- ja jääkaappisäilytyksen jälkeen

Tulokset muuttuvat pienempään suuntaan määritysten välillä MCHC:n osalta. Koeryhmän näytteiden MCHC:n osalta tulokset ovat seuraavat: maksimimuutos 33,00 g/l, minimimuutos 11,00 g/l ja mediaani 23,00 g/l (kuvio 12). Vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien MCHC:n maksimimuutos oli 33 g/l, minimimuutos 11,00 g/l ja mediaani 21,50 g/l. Vertailuryhmän +4 °C jääkaapissa säilytettyjen näytteiden maksimimuutos oli 9,00 g/l, minimimuutos nolla ja mediaani 2,50 g/l.



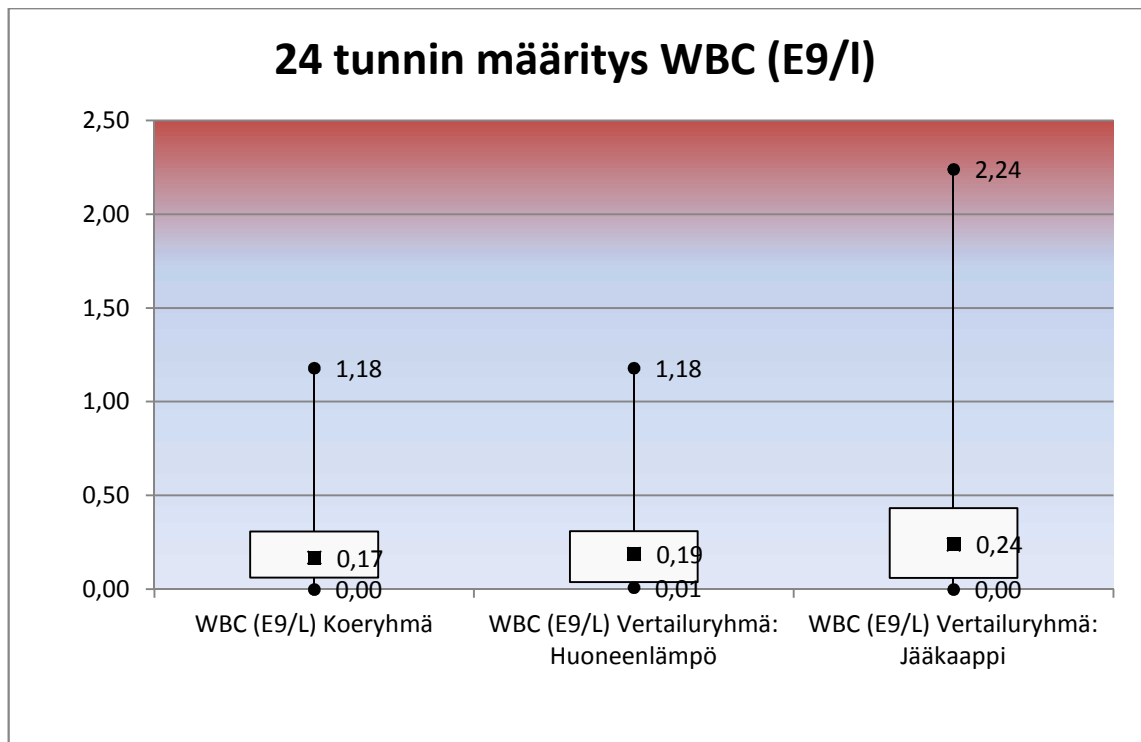
KUVIO 13: RDW-SD:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrityksestä

Tulokset muuttuvat RDW-SD:n osalta nousevaan suuntaan määritysten välillä. Koeryhmän RDW-SD:n maksimimuutokseksi saatiin 14,20 fl, minimimuutokseksi 4,30 fl ja mediaaniksi 7,35 fl (kuvio 13). Vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien maksimimuutos oli 14,20 fl, minimimuutos 4,30 fl ja mediaani 7,30 fl. Vastaa- vasti +4 °C jääkaapissa säilytettyjen näytteiden maksimimuutos oli 1,10 fl, minimimuutos nolla ja mediaani 0,35 fl.



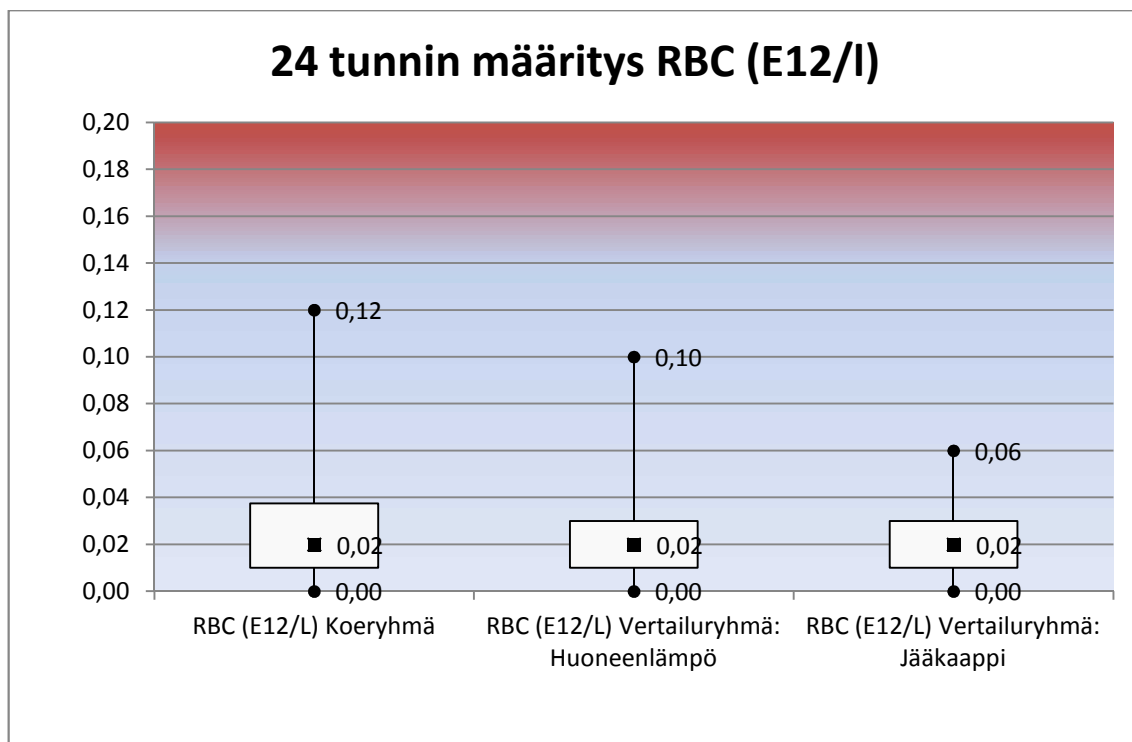
KUVIO 14: RDW-CV:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrittäyksestä

Määrittysten väliset tulokset nousevat RDW-CV:n osalta. Koeryhmän RDW-CV:n maksimuutos oli 3,40 yksikköä, minimimuutos 0,30 yksikköä ja mediaani 1,10 yksikköä (kuvio 14). Vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien maksimuutos oli 2,10, minimimuutos 0,40 ja mediaani 1,00 yksikköä, kun taas vertailuryhmän +4 °C jääkaapissa säilytettyjen näytteiden maksimuutos oli 0,30 yksikköä, minimimuutos nolla ja mediaani 0,10 yksikköä.



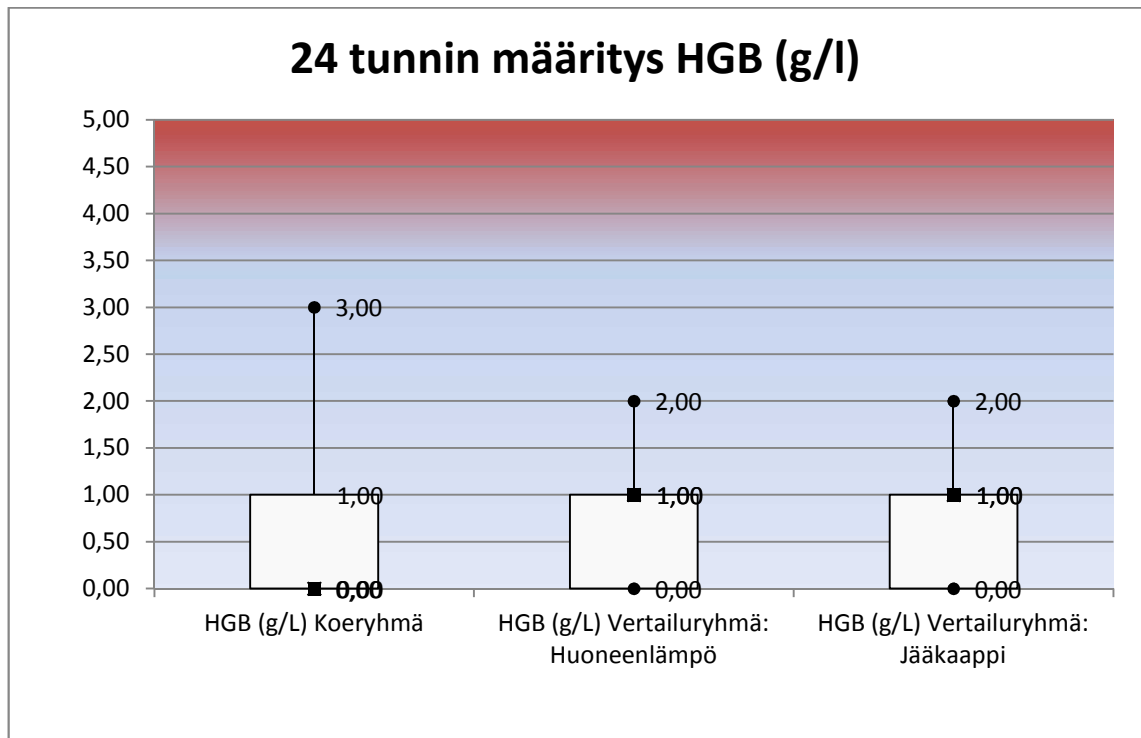
Kuvio 15: WBC:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrityksestä

Leukosyyttien määrän muutoksessa ei ole selvää suuntaa, vaan niiden määrä sekä suurenee että pienenee. Koeryhmän näytteiden maksimimuutos oli 1,18 E9/l, minimimuutos nolla ja mediaani 0,17 E9/l (kuvio 15). Vertailuryhmän vastinputkien maksimimuutos oli 1,18 E9/l, minimimuutos 0,01 E9/l ja mediaani 0,19 E9/l. Vertailuryhmän +4 °C jääkaappisäilytyksessä olleiden näytteiden maksimimuutos oli 2,24 E9/l, minimimuutos nolla ja mediaani 0,24 E9/l.



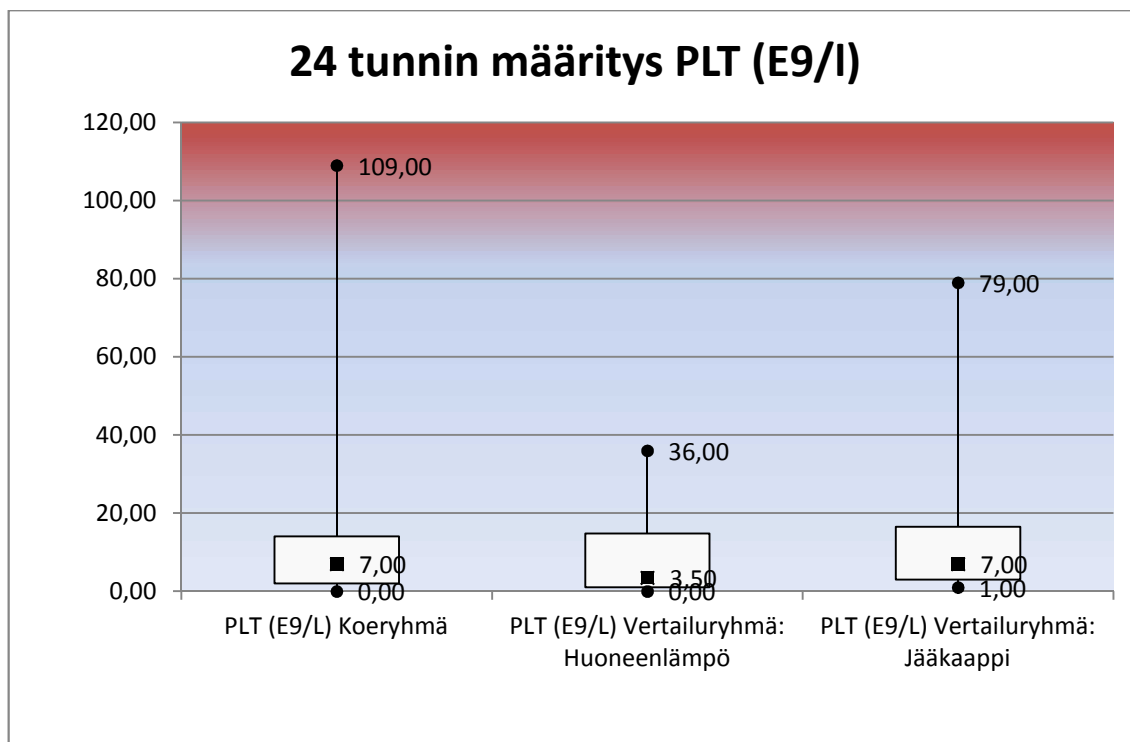
KUVIO 16: RBC:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrityksestä

Koeryhmän RBC:n maksimimuutos oli 0,12 E12/l 24, minimimuutos nolla ja mediaani 0,02 E12/l (kuvio 16). Vertailuryhmän vastinputkien RBC:stä saadut tulokset muuttuivat maksimissaan 0,10 E12/l. Minimimuutos nolla. Mediaaniksi saatiin 0,02 E12/l. Vertailuryhmän +4 °C jääkaappisäilytyksessä olleiden näytteiden RBC -tuloksissa maksimimuutos oli 0,06 E12/l, minimimuutos nolla ja mediaani 0,02 E12/l.



KUVIO 17: HGB:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrityksestä

Koeryhmän hemoglobiinin maksimimuutos oli 3,00 g/l, minimimuutos nolla ja mediaani 1,00 g/l (kuvio 17). Vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien ja 24 tuntia +4 °C jääkaapissa säilytettyjen näytteiden hemoglobiinin määrän maksimimuutos oli 2,00 g/l, minimimuutos nolla ja mediaani 1 g/l. Vertailuryhmän jääkaapissa säilytettyjen näytteiden muutokset ja mediaani olivat samat kuin vastinputkilla.



Kuvio 18: PLT:n muutos 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä määrityksestä

Koeryhmän näytteiden maksimimuutos oli 109 E9/l, minimimuutos nolla ja mediaani (kuvio 18). Vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien maksimimuutos oli 36 E9/l, minimimuutos nolla ja mediaani 3,50 E9/l. Vertailuryhmän näytteiden +4 °C jääkaapissa säilytettyjen näytteiden maksimimuutos oli 79 E9/l, minimimuutos 1 E9/l ja mediaani 7 E9/l.

8.3 Johtopäätökset

Kahdeksan tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen tapahtui seuraavia muutoksia täydellisen verenkuvan parametreissa ensimmäiseen määritykseen verrattuna: HCT, MCV, RDW-SD, RDW-CV suurenivat ja MCHC pieneni. Trombosyyttiarvossa tapahtui sekä suurenemista että pienenemistä. Kyseiset parametrit muuttuivat vielä enemmän 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Muissa parametreissa ei tapahtunut huomattavaa muutosta 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen.

Sysmex[®] XE-5000 laskee MCHC:n ja MCV:n kaavalla, jossa käytetään hematokriitistä saatua tulosta. Erytrosyyttien keskitilavuus lasketaan jakamalla hematokriitti RBC:llä. Näin ollen MCV-arvo kohoaa, koska hematokriitti nousee huoneenlämpösäilytyksen jälkeen erytrosyyttien turpoamisen takia. Sysmex[®] XE-5000 jakaa MCHC:ta laskettaessa hemoglobiinin hematokriitilla. Näin ollen MCHC laskee. Toisaalta MCH ei muutu, koska sen kaavassa käytetään RBC:n ja hemoglobiinin tuloksia jotka eivät muutu olennaisesti huoneenlämpösäilytyksessä. Erytrosyyttien turpoaminen näkyy myös erytrosyyttien histogrammissa, jota käytetään sekä RDW-SD:n että RDW-CV:n laskennassa. Tästä syystä RDW-SD ja RDW-CV nousevat huoneenlämpösäilytyksessä.

Vertailuryhmästä ainoastaan trombosyyttiarvossa tapahtui muutosta huoneenlämpösäilytykseen verrattuna. Muissa parametreissa ei tapahtunut merkittävää muutosta. Vertailuryhmän näytteiden trombosyytti-arvoista 75 % muuttui enintään 16,5 E9/l. Huoneenlämmössä olleiden vastinputkien trombosyytti-arvoista 75 % muuttui enintään 14,75 E9/l. Vertailuryhmän ja vastinputkien ero on tosin vain 1,85 E9/l. Muutos ei ole merkittävän suuri, mutta on mahdollista että trombosyytit säilyvät paremmin huoneenlämmössä kuin jääkaapissa. Toisaalta myös Imeri ym. (2008, 68) totesivat tutkimuksessaan, että trombosyytit säilyvät paremmin huoneenlämpö- kuin jääkaappisäilytyksessä.

Trombosyytti-arvon maksimimuutoksessa oli myös suuri piikki. Tämä saattoi johtua virheellisestä mittaustuloksesta, jonka on aiheuttanut trombosyyttien kasautuminen. Analysaattori antoi hälytyksen trombosyyttikasoista ja trombosyyttien koon vaihtelusta näytteestä, jossa tapahtui maksimimuutos. Sysmex XE-5000 –analysaattori määrittää näytteen trombosyytit ensin impedanssilla. Jos Sysmex[®] XE-5000 –analysaattori antaa näytteelle trombosyyttikasa –liputuksen ja näyte määritetään myöhemmin uudelleen samalla viivakoodilla, analysaattori määrittää trombosyytit uudelleen optisesti eikä impedanssilla. Näin ollen saman näytteen trombosyyteistä saatu tulos saattaa vaihdella, jos näyte ajetaan uudelleen. Tämä saattoi johtaa trombosyyttien tulosten vaihtelevuuteen kahdeksan ja 24 tunnin mittausten jälkeen näytteissä, joille Sysmex XE-5000 –analysaattori oli antanut liputuksen trombosyyttikasoista. Joissain näytteissä saattoi myös tapahtua EDTA:sta johtuvaa pseudotrombosytopeniaa, jolloin analysaattori mittaa trombosyyttien määrän virheellisen alhaiseksi.

Leukosyyttien määrässä huomattiin piikki 24 tunnin jääkaappisäilytyksen jälkeen. Tämä saattoi johtua vain mittausten välisistä eroista. Sekä koeryhmän että vertailuryhmän huoneenlämmössä säilytettyjen vastinputkien leukosyyttien määrästä 75 % oli enintään 0,31 E9/l ja vertailuryhmän tuloksista 75 % oli enintään 0,43 E9/l. Muutos näiden välillä on siis vain 0,12 E9/l, joka ei ole merkittävän suuri. Vertailuryhmän vastinputkien mediaani oli 0,19 E9/l ja vertailuryhmän mediaani oli 0,24 E9/l. Vertailuryhmän vastinputkien ja vertailuryhmän mediaanien välinen ero oli vain 0,05 E9/l. Näin ollen voidaan todeta, että jääkaappisäilytyksessä oleva maksimimuutos 2,24 E9/l oli vain yksittäinen piikkiarvo.

Saaduista tuloksista voidaan päätellä, että täydellinen verenkuva ei kaikkien parametrien osalta säily tutkimuskelpoisena 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Tutkimuksen perusteella olisi suositeltavaa, että näytteitä säilytettäisiin +4 °C jääkaappilämpötilassa, eikä huoneenlämmössä. Täydellinen verenkuva kuitenkin säilyy tutkimuskelpoisena WBC:n, RBC:n ja leukosyyttien erittelylaskennan osalta 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen.

Myös muissa tutkimuksissa oli saatu samansuuntaisia tuloksia kuin opinnäytetyössä. Imeri ym. (2008, 68-71) julkaisemassa tutkimuksessa MCV, hematokriitti ja leukosyytit säilyivät paremmin jääkaappilämpötilassa kuin huoneenlämmössä. Trombosyytit säilyivät paremmin huoneenlämmössä kuin jääkaappilämpötilassa. Tutkituista parametreista MCH, hemoglobiini ja erytrosyytit säilyivät vähintään kahden vuorokauden ajan lähes muuttumattomana huoneenlämmössä säilytettynä. Samoihin tuloksiin päädyttiin myös opinnäytetyössä.

Kuten opinnäytetyössä, myös de Baca ym. (2005, 28-36) havaitsivat MCV:n, hematokriitin ja RDW:n suurenemista sekä MCHC:n pienenemistä vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Kyseisessä tutkimuksessa selvisi myös, että leukosyyttien kokonaismäärä, erytrosyyttien määrä, hemoglobiini, MCH ja trombosyytit olivat lähes muuttumattomia vuorokauden huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Opinnäytetyössä todettiin myös erytrosyyttien, leukosyyttien, hemoglobiinin ja MCH:n tulosten vähäiset muutokset 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen, mutta trombosyyteissä huomattiin merkittäviä muutoksia.

Sekä Gulati ym. (2002, 336-342) että Lippi ym. (2005, 333-340) huomasivat myös samansuuntaisia tuloksia kuin edellä mainituissa tutkimuksissa. Kummassakin tutkimuksessa MCV ja hematokriitti suurenivat ja MCHC pieneni pitkittyneessä huoneenlämpösäilytyksessä. Lisäksi Gulati. ym (2002, 362-342) totesivat myös RDW:n suurenemista huoneenlämpösäilytyksessä. Kummassakin tutkimuksessa muut parametrit säilyivät lähes muuttumattomina huoneenlämmössä säilytettynä. Lippi ym. (2005, 333-340) tutkimuksessa todettiin myös, että kaikki parametrit säilyvät paremmin +4 - +8 °C jääkaappilämpötilassa säilytettynä.

POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten EDTA-verinäytteet säilyvät, kun niitä säilytetään huoneenlämmössä 24 tuntia. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa informaatiota siitä, ovatko täydellisten verenkuvanäytteiden tulokset luotettavia pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Seinäjoen keskussairaala hyödyntää tätä informaatiota suunnitellessaan maakunnista tulevien näytteiden kuljetusolosuhteita. Tutkimusongelmana oli selvittää EDTA-antikoagulantin ja huoneenlämmön vaikutus verisolujen säilyvyyteen ajan funktiona.

Tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että huoneenlämmön ja EDTA-antikoagulantin yhteysvaikutuksesta johtuen täydellinen verenkuvanäyte ei säily hematokriitin, MCV:n, MCHC:n, RDW-SD:n ja RDW-CV:n osalta tutkimuskelpoisena 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Kyseisten parametrien tulokset alkavat vaihtelemaan ensimmäiseen määrittämiseen verrattuna jo kahdeksan tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Muiden täydellisen verenkuvan parametrien kohdalla ei tapahdu merkittävää muutosta 24 tunnin huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Vertailuryhmän näytteitä säilytettiin +4 °C jääkaappilämpötilassa 24 tunnin ajan. Vuorokauden jälkeen yhdessäkin parametrissa ei tapahtunut merkittäviä muutoksia.

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian toimintayksikkö voi hyödyntää tätä informaatiota muuttamalla maakunnasta tulevien näytteiden kuljetusolosuhteita. On suositeltavaa, että näytteet kuljetettaisiin kylmäkuljetuksena +4 °C lämpötilassa. Kylmäkuljetus poistaa pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen aiheuttamat vaikutukset täydellisistä verenkuvanäytteistä ja parantaa tulosten luotettavuutta. Opinnäytetyössä otettiin huomioon vain huoneenlämpösäilytys ja sen kesto. Näin ollen muut muuttujat, kuten kuljetuksen aikainen tärinä, voivat vaikuttaa täydellisen verenkuvan tulosten luotettavuuteen.

Opinnäytetyössä pysyttiin hyvin suunnitellussa aikataulussa vaikka teoriaosa työstettiinkin loppuun muutamaa kuukautta alkuperäistä suunnitelmaa myöhemmin. Teoriaosuuden työstäminen sujui ilman suuria ongelmia. Kaikista haastavinta oli löytää lähdemateriaalia EDTA-antikoagulantista, mutta lopulta sitäkin löytyi kattavasti, sekä suomalaisia että ulkomaalaisia lähteitä. Saatuihin tutkimustuloksiin ja niistä johdettuihin johtopäätöksiin oltiin tyytyväisiä, koska ne ratkaisivat tutkimusongelman: EDTA-

antikoagulantin ja huoneenlämpösäilytyksen vaikutus veren solujen säilyvyyteen ajan funktiona. Tulosten avulla päästiin myös asetettuun tavoitteeseen.

Opinnäytetyön luotettavuutta eli reliabiliteettia lisää se, että kaikki EDTA-veriputket analysoitiin joka mittausajankohdassa samalla analysaattorilla. Näin poistettiin mahdolliset analysaattorien väliset erot. Lisää luotettavuutta tuo se, että jokaisella vertailuryhmän näytteellä oli vastinputki, jota säilytettiin huoneenlämmössä. Näistä näytteistä määritettyjä tuloksia voitiin vertailla luotettavasti toisiinsa. Päivittäinen 820-kontrolli määritettiin aamulla, iltapäivällä ja illalla, tämä lisää osaltaan luotettavuutta. Näytteitä saatiin yhteensä 142 kappaletta. Tilastollisen tutkimuksen mukaan otoskoon alaraja on 100, joten näytteitä saatiin opinnäytetyöhön tarpeeksi. Vertailuryhmään ei otettu yhtä monta näytettä kuin koeryhmään (106 kappaletta), sillä epäiltiin, että opinnäytetyön kokeelliseen osuuteen varattu aika ei olisi ollut riittävä.

Tulosten tarkastelun yhteydessä huomattiin, että yhden jääkaapissa säilytetyn näytteen tulos puuttui kokonaan. Tämän takia myös sen vastinputken tuloksia ei otettu mukaan tutkimukseen. Kuvioita tehtäessä huomattiin myös yhden vertailunäytteen erytrosyytti-indeksien maksimimuutoksissa huomattava piikki. Kyseisen vertailunäytteen kohdalla kaikki erytrosyytti-indeksit, jotka pysyivät kaikkien muiden jääkaapissa säilytettyjen näytteiden osalta muuttumattomina, muuttuivat ensimmäiseen määrittelyyn verrattuna. Tästä syystä näytettä ei otettu mukaan tutkimukseen. Tämä ratkaisu ei vaikuta oleellisesti tutkimuksen luotettavuuteen ja validiteettiin, koska huoneenlämpösäilytykseen jäi yhteensä 106 näytettä ja jääkaapissa säilytettyyn vertailuryhmään 36 näytettä. Näin ollen otoksen hävikki ei ole merkittävä.

Tulosten analysoinnissa käytettiin juoksevaa numerointia ja viivakooditarroja jotka laitettiin EDTA-veriputkiin potilaan tunnistetietojen päälle. Näin varmistettiin potilaiden yksityisyyssuojan säilyminen, koska potilaiden nimiä ei käytetty ollenkaan tutkimuksessa. Potilailta ei tarvinnut kysyä erillistä lupaa ylimääräiseen näytteeseen, sillä potilaasta otettiin joka tapauksessa verinäytteitä ja näytteet otettiin Seinäjoen keskussairaalan laboratoriotointia kehittävään toimintaan.

Opinnäytetyöntekijät ottivat kaikki opinnäytetyössä käytettävät valokuvat itse. Analysaattorin ja laitteiden omistajalta, eli Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian toimintayksiköltä, kysyttiin lupa otettujen valokuvien käyttämiseen opinnäytetyössä. Valokuvia otettaessa varmistettiin myös se, että kuvissa ei näy mitään asiankuulumatonta, kuten työntekijöiden kasvoja tai muuta, josta heidät voisi tunnistaa.

Ennen kokeellisen osuuden suorittamista perehdyttiin aihetta käsittelevään lähdeaineistoon. Tämän pohjalta tehtiin opinnäytetyön teoriaosuus. Lähdeaineistona käytettiin monipuolisesti sekä suomalaisia että ulkomaalaisia lähteitä. Pääosa suomalaisista lähteistä oli hematologiaa ja eri tutkimusten suoritusta sekä teoriaa käsitteleviä kirjoja. Opinnäytetyössä käytettiin myös Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian laboratorion tutkimusohjeita TVK:n ja PVK:n osalta.

Ulkomaalaiset lähteet olivat hematologiaa käsitteleviä kirjoja, artikkeleja sekä tutkimuksia. Sysmex® XE-5000 –analysaattorista kerättiin informaatiota laitevalmistajan omista ohjeista ja manuaaleista. Suurin osa lähteistä oli 1990- ja 2000-luvulta, mutta opinnäytetyössä on myös muutama lähde 1980-luvulta. Toinen näistä 1980-luvun lähteistä käsittelee EDTA-antikoagulanttia ja neutrofiilien kypsymistä. Tämä lähde sisältää tietoa, joka on edelleen paikkaansa pitävää. Toinen 1980-luvun lähde on tutkimus, josta saadut tulokset ovat samansuuntaisia, kuin 1990- ja 2000-luvulla tehdyistä tutkimuksista saadut tulokset.

Opinnäytetyötä kirjoitettaessa poikettiin muotovaatimuksista, koska kypsyvien solujen kuvat haluttiin laittaa vierekkäin, sillä siten niiden kehittyminen epäkypsimmästä kypsimpään muotoon saatiin esitettyä parhaiten. Esitystavan vuoksi kuvien alle ei mahtunut kuvan nimeä ja tekijänoikeuksia. Ongelma ratkaistiin nimeämällä kuvat juoksevilla numerolla ja kirjaimella, sillä ne mahtuivat kuvien alle. Kuvat nimettiin kuvateksteissä, jotka olivat sijoitettu suoraan kuvien alapuolelle. Kuvatekstissä myös ilmoitettiin kuvien tekijänoikeudet.

Yhteistyö Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian toimintayksikön kanssa sujui hyvin. Työt jakaantuivat tasaisesti opinnäytetyön tekijöiden kesken ja yhteistyö sujui moitteettomasti. Opinnäytetyötä tehdessä opittiin, kuinka paljon erilaisia yksityiskohtia täytyy ottaa huomioon, jotta voidaan toteuttaa onnistunut kokeellinen tutkimus. Opinnäytetyön työstäminen on opettanut suunnitelmallisuutta ja kehittänyt ongelmanratkaisukykyä.

Jatkotutkimusaiheena voisi olla se, miten huoneenlämpösäilytys vaikuttaa leukosyyttien morfologiaan ja tunnistettavuuteen. Kuljetuksen aiheuttamia muita tekijöitä, kuten värinän vaikutus soluihin voisi tutkia. Opinnäytetyötä vastaavan työn voisi toteuttaa vastasyntyneiden näytteillä. Aiheena voisi olla myös trombosyyttien säilyvyystutkimus, jossa keskityttäisiin pelkästään niihin. Tässä aiheessa kannattaisi kiinnittää huomiota juuri siihen, kuinka trombosyytit käyttäytyvät pitkittyneessä jääkaappisäilytyksessä. Jatkotutkimusaiheena voisi myös olla muiden EDTA-antikoagulanttien, kuten K3-EDTA:n, vaikutusten tutkiminen täydelliseen verenkuvanäytteeseen pitkittyneen huoneenlämpösäilytyksen jälkeen. Säilyvyystutkimuksen voisi myös suorittaa muille hematologisille tutkimuksille.

LÄHTEET

Anderson, S. & Poulsen, K. 2003. Atlas of hematology. 1. painos. Yhdysvallat: Lippincott Williams & Wilkins

Anttila, P. 2005. Ilmaisu, teos, tekeminen ja tutkiva toiminta. Tallinna: AS Pakett

Banfi, G., Salvagno G. & Lippi, G. 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine vol 45 nro 5, 565-576

Briggs, C. & Bain, BJ. 2012. Basic hematological techniques. Teoksessa Bain, BJ., Bates, I., Laffan, MA. & Lewis, SM. (toim.) Practical Haematology. 11. painos. Kiina: Churchill & Livingstone, 23-56

Burns, C. 2004. Routine Hematology Procedures. Teoksessa McKenzie, S. (toim.) Clinical laboratory hematology. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 123-139

Camitta, BM. & Slye, RJ. 2012. Optimizing Use of the Complete Blood Count. Pediatria Polska vol 87 nro 1, 72-77

Clayberger, C. & Krensky, A. T-cell and NK-cell Immunity. 2005. Teoksessa Hoffman, R., Benz, E., Shattil, S., Furie, B., Cohen, H., Silberstein, L. & McGlave, P. (toim.) Hematology: Basic Principles and practice. 4. painos. Philadelphia Pennsylvania: Elsevier Inc, 135-147

Clinical and Laboratory Standards Institute. 1993. Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for ethylene diamine tetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing: Expert Panel on Cytometry. American Journal of Clinical Pathology vol 100 nro 4, 371-372

Cohle, SD., Saleem, A. & Makkaoui DE. 1981. Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. American Journal Of Clinical Pathology vol 76 nro 1, 67-69

de Baca, M., Gulati, G., Kocher, W. & Schwarting, R. 2005. Effects of Storage of Blood at Room Temperature on Hematologic Parameters Measured on Sysmex XE-2100. *LabMedicine* vol 37 nro 1, 28-36

Dorshkind, K. & Rawlings D. B-cell development. 2005. Teoksessa Hoffman, R., Benz, E., Shattil, S., Furie, B., Cohen, H., Silberstein, L. & McGlave, P. (toim.) *Hematology: Basic Principles and practice*. 4. painos. Philadelphia Pennsylvania: Elsevier Inc, 119-133

EPSHP. 2011a. Täydellinen verenkuv. Päivitetty 19.4.2011.
<http://www.epshp.org/kotisivut/labnet/html/index.htm>

EPSHP. 2011b. Perusverenkuv ja trombositit. Päivitetty 5.5.2011
<http://www.epshp.org/kotisivut/labnet/html/index.htm>

EPSHP. 2012. Retikulosyytit. Päivitetty 1.1.2012.
<http://www.epshp.org/kotisivut/labnet/html/index.htm>

George-Gay, B. & Parker, K. 2003. Understanding the complete blood count with differential. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* vol 18 nro 2, 96-117

Goossens, W., Van Duppen, V. & Verwilghen, RL. 1991. K2- or K3-EDTA: The anti-coagulant of choice in routine haematology? *Clinical and Laboratory Hematology* vol 13 nro 3, 291-295

Gulati, G., Hyland, L., Kocher, W. & Schwarting, R. 2003. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* vol 126, 336-342

Hadzimusic, N., Katica M., Muharemovic Z. & Mušanovic J. 2010. Effect of Temperature Storage on Hematological Parameters of Avian Turkey Blood. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health* vol 2 nro 5, 158-166

Hajontaluvut-kvartiiliväli, kvartiilivälin pituus ja kvartiilipoikkeama. 2012. Tilastokeskus. Luettu 3.9.2012. [http:// http://www.stat.fi](http://www.stat.fi)

Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. 7. painos. Helsinki: Edita Prima Oy

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Hoffbrand & Moss. 2011. Essential Haematology. 6. painos. Singapore: Wiley-Blackwell

Imeri, F., Herklotz, R., Risch, L., Arbetsleitner, C., Zerlauth, M., Risch, G. & Huber, A. 2008. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. Clinica Chimica Acta International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine vol 397 nro 1-2, 68-71

Itälä, M. & Vilpo, J. 2007. Krooninen lymfaattinen leukemia ja muut lymfositootit. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A. & Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3., uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 375-392

Jury, C., Nagai, Y. & Tatsumi, N. 2012. Collection and handling of blood. Teoksessa Bain, BJ., Bates, I., Laffan, MA. & Lewis, SM. (toim.) Practical Haematology. 11. painos. Kiina: Churchill & Livingstone, 1-10

Khanna-Gupta, A. & Berliner, N. 2005. Granulocytopoiesis and monocytopenia. Teoksessa Hoffman, R., Benz, E., Shattil, S., Furie, B., Cohen, H., Silberstein, L. & McGlave, P. (toim.) Hematology: Basic Principles and practice. 4. painos. Philadelphia Pennsylvania: Elsevier Inc, 289–302

Laininen, P. 2004. Tilastollisen analyysin perusteet. 3. painos. Helsinki: Hakapaino Oy

Lippi G., Salvagno G., Solero G., Franchini M. & Guidi G. 2005. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematology analyzer. The journal of Laboratory and Clinical Medicine vol 146 nro 6, 333-340

Lippi, G., Salvagno, G., Montagnana, M., Banfi, G. & Guidi G. 2007. Evaluation of Different Mixing Procedures for K2 EDTA Primary Samples on Hematological Testing. *LabMedicine* vol 38 nro 12, 723-725

Lippi, G. & Plebani, M. 2012. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vol 50 nro 8, 1281–1285

Long, M. & Hoffman, R. Thrombocytopoiesis. 2005. Teoksessa: Hoffman, R., Benz, E., Shattil, S., Furie, B., Cohen, H., Silberstein, L. & McGlave, P. (toim.) Hemtalogy: Basic Principles and practice. 4. painos. Philadelphia Pennsylvania: Elsevier Inc, 303-320

Mahlamäki, E.K. 2004. Verenkuvan tutkimukset. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY, 268–281

Médaille C., Briend-Marchal A. & Braun JP. 2006. Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. *Veterinary Clinical Pathology* vol 35 nro 1, 18-23

Papayannopoulou, T., D’Andrea, A., Abkowitz, J. & Migliaccio, A. 2005. Biology of erythropoiesis, erythroid differentiation, and maturation. Teoksessa Hoffman, R., Benz, E., Shattil, S., Furie, B., Cohen, H., Silberstein, L. & McGlave, P. (toim.) Hematology: Basic Principles and practice. 4. painos. Philadelphia Pennsylvania: Elsevier Inc, 267-288

Perkins, S. 2009. Examination of the blood and bone marrow. Teoksessa Greer, J., Foesrster, J., Lukens, J., Rodgers, G., Paraskevas, F. & Glader, B. Wintrobe’s clinical hematology. 12. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1

Phillips, J., Coiner, J., Smith, E., Becker, D. & Leongs, J. 1998. Performance of K2EDTA- vs. K3EDTA-collected blood specimens on various hematology analyzers. *Laboratory Hematology* vol 4, 17-20

Roche Diagnostics Oy. ND. Sysmex XS-1000i Liputukset.

Savolainen, E-R. 2007. Verinäytteet ja verenkuvatutkimukset. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A. & Krusius, T. (toim.) Veritaudit. 3. painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 85-99

Siitonen, T. & Koistinen, P. 2007. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A. & Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 16-31

Van den Bossche, J., Devreese, K., Malfait, R., Van de Vyvere, M., Wauters, A., Neels, H. & De Schouwer, P. 2002. Reference Intervals for a Complete Blood Count Determined on different Automated Haematology Analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine vol 40 nro 1, 69-73

Vilkka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi

Vilpo, J. (toim.) 2010. Veritaudit. Kolmas uudistettu painos. Helsinki: Medivil Oy.

Williams, L. Cellular homeostasis and hematopoiesis. 2004. Teoksessa: Clinical laboratory hematology. 2004. McKenzie, S. New Jersey: Pearson Education Inc, 8-40

Wintrobe, M., Lee, R., Boggs, D., Bithell, T., Foerster, J., Athens, J. & Lukens J. 1981. Clinical Hematology. 8. painos. Lea & Febiger. Philadelphia.

Zandecki, M., Genevieve, F., Gerard, J. & Godon, A. 2007. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: A review. Part II: White blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. International Journal of Laboratory Hematology vol 29 nro 1, 21-41

Zumdahl, S. 1998. Chemical Principles. 3. painos. Boston: Houghton Mifflin Company

LIITTEET

LIITE 1. TÄYDELLISEN VERENKUVAN VIITEARVOT

B-Hb	naiset	117-155 g/l
	miehet	134-167 g/l
B-HKR	naiset	0.35-0.46
	miehet	0.39-0.50
B-Eryt	naiset	3.90-5.20 E12/l
	miehet	4.25-5.70 E12/l
E-Retik		0.5 - 1.5 %
B-Leuk		3.4-8.2 E9/l
E-MCV		82- 98 fl
E-MCH		27-33 pg
E-MCHC		320-355 g/l
E-RDW		alle 15 %
B-Trom		150-360 E9/l
B-Neut		1.5-6.7 E9/l
B-Eos		0.03-0.44 E9/l
B-Baso		0.0-0.1 E9/l
B-Monos		0.2-0.8 E9/l
B-Ly		1.3-3.6 E9/l

(EPSHP 2011a; EPSHP 2011b; EPSHP 2012)

LIITE 2. NÄYTTEENOTTO-OHJEISTUS.

Hei!

Me teemme opinnäytetyötä täydellisen verenkuvan säilyvyydestä. Huoneenlämmössä säilytettävät putket otamme normaaleista potilasnäytteistä, mutta tarvitsemme teidän apuanne verrokkinäytteiden keräämiseen. Tämä tarkoittaa, että potilaista joista otetaan PVK tai TVK otetaan myös yksi ylimääräinen EDTA-putki meidän opinnäytetyötämme varten. Tarvitsemme näitä näytteitä vähintään 30 kappaletta. Kaikkien näytteenottajien ei tarvitse ottaa ylimääräisiä näytteitä vaan riittää, jos esimerkiksi kaksi näytteenottajaa ottaa näytteet. Näytteenotto suoritetaan kahtena päivänä, maanantaina ja tiistaina, hematologian osastolta.

Potilailta ei tarvitse kysyä erillistä lupaa tämän ylimääräisen putken ottoon, koska näytteet otetaan laboratorion kehittämistä edistävään tutkimukseen. Työssämme käsittelemme kaikki näytteet nimettömästi.

Kiitos!

Terveisin Jesse Lehtola ja Werner Hyvärinen

K09MBIOAN

Tampereen ammattikorkeakoulu

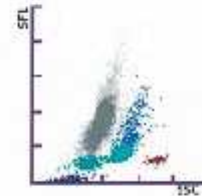
LIITE 3. TVK VASTAUSTULOSTE

Sample No.: [REDACTED] Rack: [REDACTED] Tube: [REDACTED] 07:58:25
 Patient ID: [REDACTED] Ward: [REDACTED] Dr: [REDACTED]
 Name: [REDACTED] Birth: [REDACTED] Sex: Male
 Comments: [REDACTED] Inst.ID: XE-5300-2

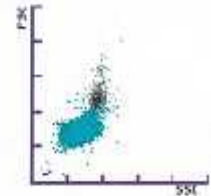
Positive
Morph.

WBC & 115.60 + [10⁹/L]
 RBC 2.65 [10¹²/L]
 HGB 98 [g/L]
 HCT 0.294 [Ratio]
 MCV 110.9 + [fL]
 MCH 37.0 [pg]
 MCHC 333 [g/L]
 PLT 58 [10⁹/L]
 RDW-SD 72.4 + [fL]
 RDW-CV 18.0 + [%]
 PDW 13.0 [fL]
 MPV 10.8 [fL]
 P-LCR 31.0 [%]
 PCT 0.06 - [%]
 NEUT --- [10⁹/L] --- [%]
 LYMPH --- [10⁹/L] --- [%]
 MONO --- [10⁹/L] --- [%]
 EO 0.35 * [10⁹/L] 0.3 * [%]
 BASO 1.64 * [10⁹/L] 1.4 * [%]
 NRBC 2.58 [10⁹/L] 2.2 [10⁹/L]
 RET 2.32 [%] 61.5 [10⁹/L]
 IRF 35.2 [%]
 LFR 64.8 [%]
 MFR 16.9 [%]
 HFR 18.3 [%]
 RET-He 39.2 [pg]
 IPF 4.3 [%]
 IG --- [10⁹/L] --- [%]
 HPC# --- [10⁹/L]
 WBC-BF [10⁶/L]
 RBC-BF [10⁶/uL]
 MN [10⁶/L] [%]
 PMN [10⁶/L] [%]

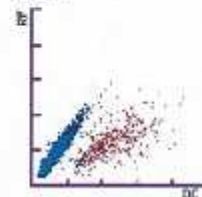
DIFF



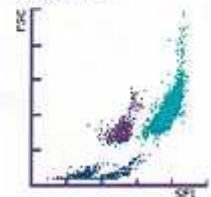
WBC/BASO



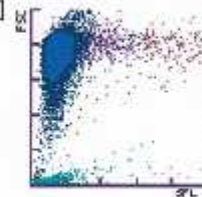
IMI



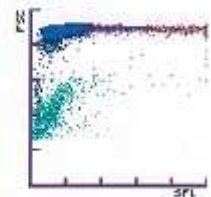
NRBC



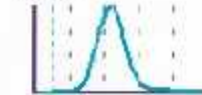
RET



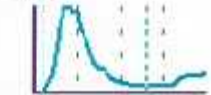
PLT-O



RBC



PLT



WBC IP Message(s)
WBC Abn Scattergram

RBC/RET IP Message(s)

PLT IP Message(s)

Immature Gran?
Left Shift?
Abn Lympho/_Blasts?

LIITE 4. HAVAINATOMATRIISI

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Tube No.	Sample ID	WBC(10 ⁹ /L)	WBC(10 ⁹ /L)	RBC(10 ¹² /L)	RBC(10 ¹² /L)	HGB(g/L)	HCT(10%)	PLT(10 ⁹ /L)	HCT(10%)	MCV(fL)	MCV(10 ⁹ /L)	MCV(fL)	MCV(10 ⁹ /L)	MCV(fL)
2	1101		660	648	552	552	128	374	0.374	688	56.5	102	102.1	120	117
3	2001.8h		648	648	552	552	128	374	0.374	677	57.7	105	105.8	128	114
4	3001.24h		665	665	558	558	130	399	0.399	715	71.5	119	119.1	119	119
5	4001.0h		691	691	570	570	140	455	0.455	750	75.0	120	120.1	120	120
6	5001.28h		675	675	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
7	6001.24h		681	681	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
8	7001.0h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
9	8001.58h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
10	9001.58h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
11	1001.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
12	1101.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
13	1201.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
14	1301.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
15	1401.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
16	1501.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
17	1601.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
18	1701.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
19	1801.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
20	1901.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
21	2001.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
22	2101.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
23	2201.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
24	2301.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
25	2401.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
26	2501.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
27	2601.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
28	2701.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
29	2801.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
30	2901.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120
31	3001.01h		685	685	575	575	140	445	0.445	701	70.1	120	120.1	120	120

